

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

PAWEŁ KRZYŚCIAK

**OCENA WYBRANYCH DETERMINANT PATOGENNOŚCI
GRZYBÓW Z RODZAJU *RHODOTORULA***

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. Anna B. Macura

Pracę wykonano w Zakładzie Mykologii Katedry Mikrobiologii.

Kierownik jednostki Anna B. Macura

Kraków, 2010

Składam serdeczne podziękowania:

Pani prof. dr hab. Annie Barbarze Macurze
za zainteresowanie mnie tematem,
cenne wskazówki i wsparcie merytoryczne
podczas wykonywania niniejszej pracy

Koleżankom i kolegom z Katedry Mikrobiologii UJCM
za wszelką udzieloną pomoc i okazaną życzliwość

Żonie Wirginii i córce Kasi
za wyrozumiałość

SPIS TREŚCI

Spis treści	3
Wykaz skrótów	5
1 Wprowadzenie	6
2 Dane z piśmiennictwa	7
2.1 Pozycja taksonomiczna i opis rodzaju.....	7
2.2 Chorobotwórczość rodzaju <i>Rhodotorula</i>	9
2.3 Biotypowanie.....	23
2.4 Determinanty patogenności grzybów chorobotwórczych.....	25
3 Cel pracy	29
4 Materiał i metody	30
4.1 Badane szczepy.....	30
4.1.1 Izolacja i identyfikacja.....	30
4.1.2 Przechowywanie szczepów.....	31
4.1.3 Biotypowanie.....	31
4.2 Badanie tolerancji temperatury.....	31
4.3 Aktywność enzymatyczna.....	32
4.3.1 Aktywność enzymów hydrolitycznych testu API ZYM.....	32
4.3.2 Aktywność fosfolipazy.....	34
4.3.3 Aktywność proteinazy.....	34
4.3.4 Aktywność lipazy.....	35
4.4 Ocena występowania dimorfizmu drożdżowo-mycelialnego.....	36
4.5 Tworzenie otoczek.....	36
4.6 Ocena zdolności tworzenia biofilmu.....	37
4.7 Ocena lekowrażliwości.....	38
4.8 Opracowanie i analiza wyników.....	39
5 Wyniki	40
5.1 Charakterystyka wyizolowanych szczepów.....	40
5.1.1 Biotypowanie.....	42
5.2 Tolerancja temperatury.....	46
5.3 Aktywność enzymatyczna.....	47
5.3.1 Aktywność enzymów w teście API ZYM.....	47

5.3.2 Aktywność fosfolipazy.....	52
5.3.3 Aktywność proteazy aspartylowej.....	54
5.3.4 Aktywność lipazy.....	56
5.4 Dimorfizm drożdżowo-mycelialny	58
5.5 Tworzenie otoczek.....	60
5.6 Zdolność tworzenia biofilmu.....	61
5.7 Lekowrażliwość.....	64
6 Dyskusja.....	66
6.1 Występowanie i charakterystyka szczepów <i>Rhodotorula</i>	67
6.1.1 Występowanie szczepów <i>Rhodotorula</i>	68
6.1.2 Biotypowanie.....	68
6.2 Tolerancja temperatury.....	72
6.3 Aktywność enzymatyczna.....	73
6.3.1 Aktywność enzymów w teście API ZYM.....	73
6.3.2 Aktywność fosfolipazy.....	74
6.3.3 Aktywność proteazy.....	76
6.3.4 Aktywność lipazy.....	79
6.4 Zmiana fenotypu.....	80
6.5 Tworzenie otoczek.....	81
6.6 Zdolność tworzenia biofilmu.....	82
6.7 Lekowrażliwość.....	86
6.8 Podsumowanie.....	88
7 Wnioski.....	89
8 Streszczenie.....	91
9 Summary.....	92
10 Spis piśmiennictwa.....	93
10.1 Wykaz odczynników i aparatury.....	118
10.1.1 Odczynniki.....	118
10.1.2 Aparatura.....	122

WYKAZ SKRÓTÓW

- 5FC** – 5-fluorocytozyna
- abt** – antybiotykoterapia
- ALL** – ostra białaczka limfatyczna
- AMB** – amfoterycyna B
- AML** – ostra białaczka szpikowa
- amt** – antymikotyterapia
- BSA** – albumina bydlęca
- cfu** – jednostki tworzące kolonie (ang. *colony forming unit*)
- CLSI** - The Clinical and Laboratory Standards Institute
- CML** – przewlekła białaczka szpikowa
- dH₂O** – woda destylowana
- FLZ** – flukonazol
- ITZ** – itrakonazol
- KTZ** – ketokonazol
- MEA** – podłoże z wyciągiem słodowym
- MCZ** – mikonazol
- MFG** – mikafungina
- NTM** – natamycyna
- NYS** – nystatyna
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- PBS** – bufor fosforanowy
- SGA** – podłoże Sabourauda z dodatkiem glukozy
- VRZ** – worikonazol
- XTT** – sól sodowa kwasu 3,3'-[1-(fenyloamino)karbonylo]-3,4-tetrazolo-bis(4-metoksy-6-nitro)benzenosulfonowego
- YNB** – wyjściowe podłoże azotowe (ang. yeast nitrogen base)

1 WPROWADZENIE

W ostatnich latach rejestruje się coraz więcej przypadków oportunistycznych zakażeń grzybiczych [190, 221]. Mikroorganizmy, które dotychczas były uważane za saprofity niezdolne do wywoływania chorób człowieka, stają się czynnikiem etiologicznym, nawet tak poważnych schorzeń, jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Drobnoustroje te określa się mianem „nowo pojawiających się patogenów” lub raczej „mikroorganizmów o nowo nabytej patogenności”, co odpowiada angielskiemu terminowi *emerging pathogens*. Rozwój cech patogenności danego gatunku jest wynikiem zmian ewolucyjnych postępujących powoli w miarę przystosowywania się drobnoustrojów do nowych siedlisk, w tym ekosystemu, jakim jest organizm człowieka. Grzyby należą do *Eucaryota*, a zatem mają rozbudowane systemy naprawy i regulacji genomu, dlatego zmiany zachodzące w nich są wolniejsze, niż u niżej zorganizowanych bakterii (*Procaryota*), czy też wirusów. U grzybów nie zachodzi pozioma transmisja genów, co w praktyce oznacza, że nabyta przez jeden szczep cecha nie jest przekazywana innym szczepom [198]. Możliwe, że wzrost notowanych przypadków zakażeń oportunistycznych jest ewolucyjnym przystosowywaniem się saprofitycznych grzybów w odpowiedzi na presję środowiska [21, 30].

Stosowanie antybiotyków i innych środków przeciwdrobnoustrojowych mających szerokie spektrum działania zaburza ontocenozę mikrobioty człowieka. Wyeliminowanie jednego gatunku pociąga za sobą wzrost liczebności populacji gatunków przetrwałych. Namnażają się głównie mikroorganizmy oportunistyczne będące często odporne na stosowane chemioterapeutyki.

Agresywność współczesnej medycyny stwarza coraz to więcej wrót zakażenia. Żywnienie pozajelitowe oraz zakładane długoterminowo wejścia do naczyń krwionośnych ułatwiają wniknięcie bytujących na skórze drobnoustrojów. Nabyta na skutek chorób, czy też leczenia, immunosupresja sprzyja tego typu infekcjom. Pacjenci zakażeni HIV, chorzy na AIDS, mający różnego typu nowotwory i podlegający ich leczeniu, chorzy z neutropenią o różnej etiologii, czy też pacjenci przygotowywani do przeszczepów lub w trakcie terapii po przeszczepie stanowią grupę ryzyka zakażeń drobnoustrojami oportunistycznymi.

2 DANE Z PIŚMIENICTWA

2.1 Pozycja taksonomiczna i opis rodzaju

Anamorficzne (rozmnażające się bezpłciowo), pigmentowane drożdże były już znane, zanim wprowadzono do mikologii metody czystej hodowli. Na przestrzeni lat, drożdże te, włączano do wielu rodzajów, takich jak *Cryptococcus*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula*, a nawet *Saccharomyces*. Pierwszą rewizję taksonomiczną grzybów należących do współczesnego rodzaju *Rhodotorula* wykonał w 1922 roku Saito. Na podstawie koloru kolonii, morfologii komórek oraz zdolności asymilacji cukrów i azotanów sklasyfikował 14 gatunków z rodzaju *Torulae* o czerwonym i żółtym zabarwieniu kolonii.

Nazwa rodzajowa *Rhodotorula* została po raz pierwszy użyta przez Francisa C. Harrisona w 1927 r., który zajmował się wówczas badaniami drożdży związanych z kanadyjskimi serami [86, 85 cytowane za 13]. Podzielił on „kolorowe” drożdże na rodzaj *Rhodotorula* i *Chromotorula*.

W 1952 roku Lodder i Kreger-van Rij dokonały „rearanżacji” rodzaju *Rhodotorula*, klasyfikując w nim 7 gatunków. Co ciekawe, przy podziale na gatunki, nie zostało wzięte pod uwagę zabarwienie kolonii. Podział ten został zakwestionowany przez Hasegawa w 1956, który przebadał szczepy wywodzące się z oryginalnych szczepów badanych przez Saito i wykazał, że opisy Lodder i Kreger-van Rij nie zgadzają się z jego opisami, które natomiast pokrywały się z oryginalnymi opisami Saito [87].

Klasyfikacja gatunków w obrębie rodzaju *Rhodotorula* ulegała ciągłym zmianom. W 1984 roku Kreger-van Rij opisywała 8 gatunków [110], a w 1998 w Kurtzman i Fell wymieniali już 34 gatunki [119]. Obecnie w obrębie rodzaju klasyfikowanych jest około 50 gatunków [18], z czego za patogenne dla człowieka uważa się trzy: *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* [141] (por. rycina 2.2).

Współcześnie rodzaj *Rhodotorula* klasyfikowany jest w rodzinie *Sporidiobolaceae* w rzędzie *Sporidiobolales* (podklasa *Microbotryomycetes*) w obrębie klasy *Pucciniomycotina* typu *Basidiomycota* królestwa *Fungi*. Gatunek typowy* dla rodzaju to

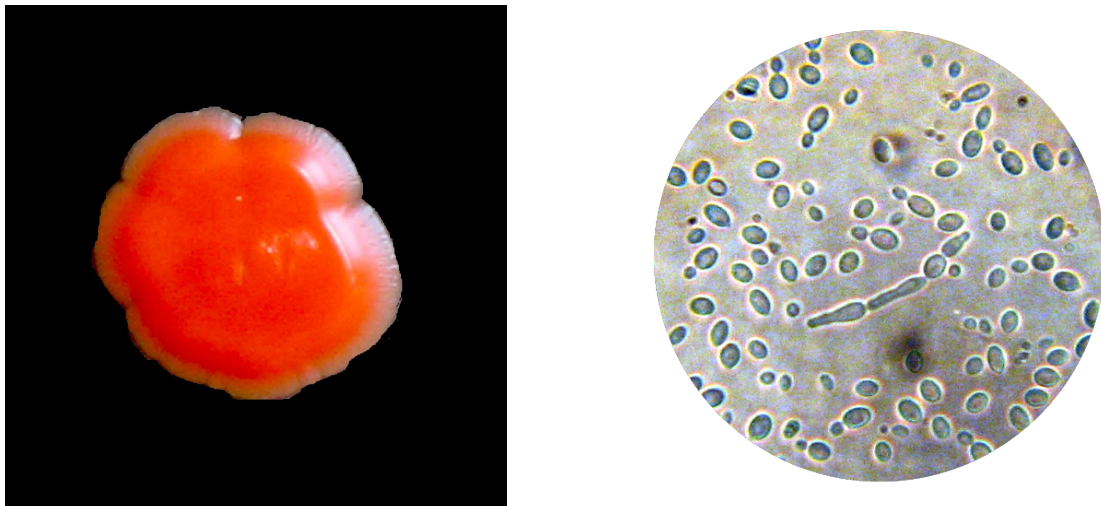
* Gatunek typowy – wzorzec taksonomiczny, gatunek wyznaczony jako typ nomenklatoryczny umożliwiający identyfikację taksonów. Okazy będące typami są przechowywane w specjalnych kolekcjach.

R. glutinis, znany wcześniej jako *Cryptococcus glutinis*, który po raz pierwszy został opisany ze śmietany kwaśnego mleka w 1850 r. przez Georga Freseniusa [68, cytowane za 13].

Charakterystyka rodzaju [58, 119].

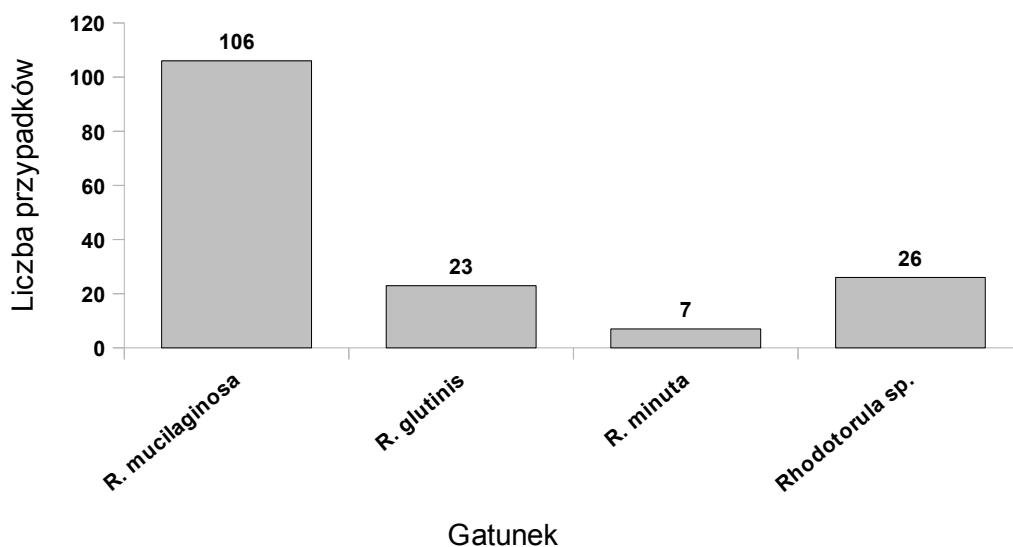
Kolonie są różowe, czerwonawe lub żółtawe, masłowate, śluzowe lub suche. Komórki są kształtu okrągłego do elipsoidalnego, jajowate do wydłużonych i zwykle pączkują jednobiegunowo. Blizna konidialna jest wąska. Mogą być wytwarzane elementy grzybni lub pseudogrzybni. Ballistokonidia są nieobecne.

Właściwości fizjologiczne. Nie fermentują cukrów. Nie asymilują *myo*-inozytolu. Wykazują dodatnią reakcję z błękitem diazoniowym B (DBB), wytwarzają ureazę, nie produkują zewnątrzkomórkowej skrobi. Wytwarzają koenzymy Q-9 lub Q-10. W ścianie komórkowej nie występuje ksyloza.



Rycina 2.1: Makro- i mikromorfologia *Rhodotorula* sp.

Po lewej - kolonia *R. mucilaginosa* o charakterystycznym czerwonoróżowym zabarwieniu; po prawej – komórki *Rhodotorula* sp.



Rycina 2.2: Udział poszczególnych gatunków w opisanych przypadkach zakażeń wywołanych przez *Rhodotorula*.

Ostatni słupek przedstawia liczbę izolatów, dla których autorzy prac kazuistycznych nie podali gatunku, ale prawdopodobnie nie były to gatunki inne niż omawiane jako patogenne dla człowieka.

2.2 Chorobotwórczość rodzaju *Rhodotorula*

Przypadki chorób z udziałem czerwonych drożdży były opisywane, zanim do nauki wprowadzono nazwę *Rhodotorula*. C.W. Dodge w książce „Medical Mycology” w rozdziale dotyczącym *Torulopsis rubra* (obecnie synonim *R. mucilaginosa*) przytacza opis izolacji tego grzyba z czerwonego sera, a następnie z kału biegunkowego dzieci, które spożyły mleko, z którego zrobiony był ten ser. W dalszej kolejności wymienia przykład doświadczenia na psach, u których po podaniu czystej zawiesiny tych drożdży obserwowane były zaburzenia jelitowe. Dodge w swojej książce powołuje się również na pracę Bagnacciego z 1926 r. opisującą przypadek zapalenia języka (*glossitis*) u niemowlęcia, w którym izolowano *R. mucilaginosa*. Podaje także, że potwierdzona

została patogenność tego gatunku na zwierzętach – po podaniu podskórnym świnkom morskim i królikom* [60].

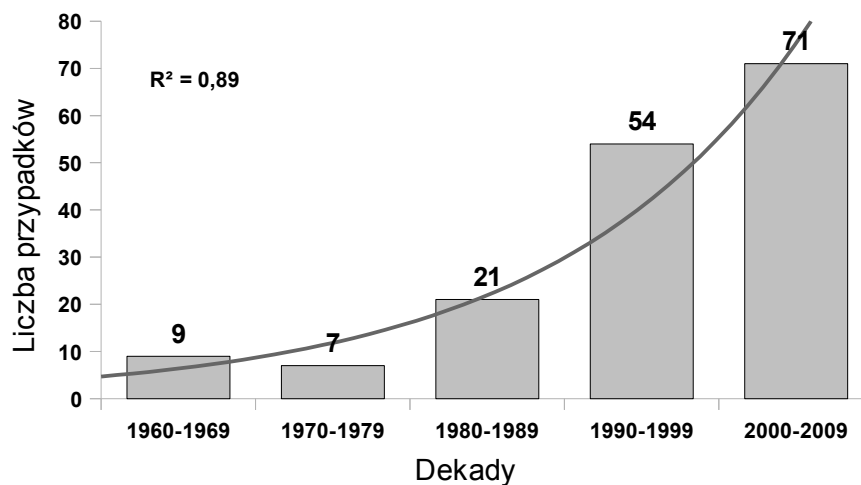
Od tego czasu opisywano kolejne przypadki zakażeń *Rhodotorula*. Były to głównie zapalenia otrzewnej związane z dializą, zakażenia oka – głównie *keratitis*, a także fungemie i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych.

W 1989 Anaissie zauważył, że za przypadki grzybic u pacjentów z nowotworami odpowiedzialne są nowe gatunki grzybów wśród nich grzyby z rodzaju *Rhodotorula* [5]. Rodzaj *Rhodotorula* uznany został za patogen o narastającym znaczeniu klinicznym (ang. *emerging pathogen*) [6, 206]. Na początku lat 90. zauważono również zwiększający się udział *Rhodotorula* w fungemiach związanych z założonymi wejściami żylnymi [25, 104]. Od tej pory zainteresowanie zakażeniami grzybami z rodzaju *Rhodotorula* wzrasta sukcesywnie, co przejawia się nie tylko wzrostem publikacji prac kazuistycznych, ale również opracowań poglądowych - por. rycina 2.3 [7, 73, 111, 233, 234].

Od 1960 roku w literaturze medycznej udokumentowanych zostało ponad 160 przypadków zakażeń *Rhodotorula* (por. tabele 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, a także rycina 2.3). Przypadki te dotyczą przede wszystkim pacjentów z immunosupresją, choć opisano także przypadki zakażeń u osób immunokompetentnych [108, 123, 138].

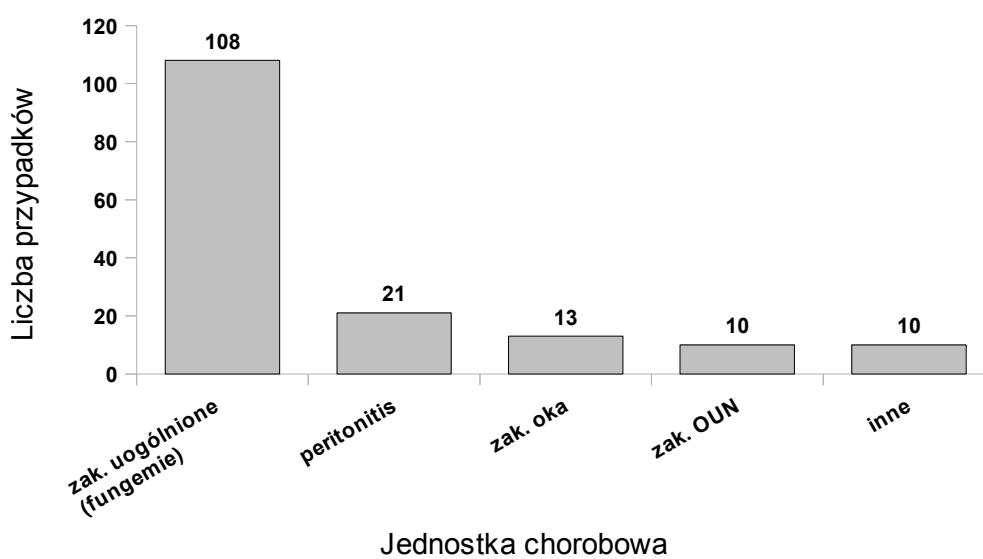
Wśród postaci rodotorulozy dominują zakażenia uogólnione (fungemie) stanowiące 66,7% opisanych przypadków. Związane są one głównie z założonym dojściem centralnym (kateterem). Udział *Rhodotorula* w fungemiach w USA i Europie ocenia się na poziomie 0,5-2,3% przypadków [234]. Drugą jednostką chorobową jest zapalenie otrzewnej związane z dializą, stanowiące 13,0% zakażeń wywołanych przez *Rhodotorula* sp. Ponadto *Rhodotorula* wywołuje zakażenia oka (8,0% przypadków) i ośrodkowego układu nerwowego (6,2%). Inne opisane zakażenia stanowią 6,2% (por. rycina 2.4). Wśród nich można wymienić zakażenia stawu biodrowego i onychomikozę (por. tabela 2.5).

* W literaturze kazuistycznej istnieją badania wskazujące, że szczepy *Rhodotorula* nie są zdolne do wywołania chorób u zwierząt doświadczalnych. Jennings i Bannet [98] poddali ocenie patogenności 57 szczepów *Rhodotorula*, zaszczepiając nimi dootrzewnowo myszy. Żadna z 57 par myszy nie zmarła ani nie rozwinęła objawów chorobowych w ciągu 2 tygodni od zaszczepienia. Dwie myszy, po jednej z dwóch różnych par, wykazały pozytywną hodowlę *R. mucilaginosa* z mózgu. Również szczep izolowany z zapalenia kanalika łzowego nie wykazał patogenności po tygodniu od zaszczepienia dootrzewnowo białej myszy [151]



Rycina 2.3: Liczba przypadków zakażeń wywołanych przez *Rhodotorula* sp. w kolejnych dekadach.

Do obliczenia liczby przypadków brano pod uwagę datę publikacji, a nie wystąpienia epizodu. Linia na rycinie przedstawia dopasowany wykres funkcji wykładniczej.



Rycina 2.4: Częstość występowanie różnych postaci zakażeń wywołanych przez *Rhodotorula* sp.

zak. – zakażenia

Tabela 2.1: Przypadki fungemii i zakażeń uogólnionych wywołanych przez *Rhodotorula* sp.*

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>Rhodotorula</i> sp.	47/K	<i>endocarditis</i>	brak	T/?	zmarł	Louria 1960 [135]
<i>Rhodotorula</i> sp.	56/M	cukrzyca, cewnik pęcherza moczowego, paciorkowcowe <i>endocarditis</i>	AMB	T/T	wyleczony	Shelburne 1962 [215]
<i>Rhodotorula</i> sp.	8/K	ALL	AMB	T/T	zmarł	Louria 1967 [134]
<i>Rhodotorula</i> sp.	68/M	rak żołądka	brak	T/T	wyleczony	Louria 1967 [134]
<i>Rhodotorula</i> sp.	69/K	rak skóry	brak	T/T	zmarł	Louria 1967 [134]
<i>Rhodotorula</i> sp.	57/K	rak szyjki macicy	AMB	T/T	zmarł	Louria 1967 [134]
<i>Rhodotorula</i> sp.	39/M	<i>endocarditis</i>	AMB	T/T	wyleczony	Leeber 1969 [125]
<i>Rhodotorula</i> sp.	47/M	<i>endocarditis</i>	brak	T/T	wyleczony	Leeber 1969 [125]
<i>R. mucilaginosa</i>	7/M	niedomykalność zastawki aortalnej i zwężenie zastawki dwudzielnej, abt	5FC p. o.	T/N	wyleczony	Naveh 1975 [154]
<i>R. glutinis</i>	66/M	zapalenie płuc	brak	T/T	wyleczony	Pien 1980 [177]
<i>R. glutinis</i>	27/M	ŻPJ, rana	brak	T/T	zmarł	Pien 1980 [177]
<i>Rhodotorula</i> sp.	37/M	AML	AMB	T/?	zmarł	Rusthoven 1984 [202]
<i>R. glutinis</i>	?/K	białaczka, niedokrwistość aplastyczna	AMB, 5FC			Datry 1988 [56]
<i>R. mucilaginosa</i>	22/K	ALL	brak	T/T	wyleczony	Anaisse 1989 [5]
<i>R. mucilaginosa</i>	62/K	<i>melanoma</i>	AMB	T/T	wyleczony	Anaisse 1989 [5]
<i>R. glutinis</i>	46/K	rak nerki	?	?	?	Silva 1989 [219]
<i>R. mucilaginosa</i>	60/M	ŻPJ	?	?	?	Silva 1989 [219]
<i>R. mucilaginosa</i>	52/K	ŻPJ	?	?	?	Silva 1989 [219]
<i>R. mucilaginosa</i>	55/M	ŻPJ	?	?	?	Silva 1989 [219]

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	16/K	ŻPJ	?	?	?	Silva 1989 [219]
<i>Rhodotorula sp.</i>	6/M	AIDS	brak	T/N	zmarł	Leibovitz 1991 [126]
<i>R. mucilaginosa</i>	30/K	zaburzenie ruchliwości jelit, ŻPJ	AMB, 5FC	T/T	wyleczony	Braun 1992 [25]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	ŻPJ, anergia skórna	?	T	?	Jimenez- Majias 1992 [99]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	ŻPJ, anergia skórna	?	T	?	Jimenez- Majias 1992 [99]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	ŻPJ, leczenie immunosupresyjne	?	T	?	Jimenez- Majias 1992 [99]
<i>R. mucilaginosa</i>	2/K	ALL	brak	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	46/K	mięsak macicy	AMB, KTZ	T/N	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	49/K	choroba Crohna	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	48/K	AML	brak	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	17/K	rak jajników	AMB	T/N	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	22/M	chłoniak	brak	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	16/M	AML	brak	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	42/M	anemia aplastyczna	AMB, KTZ	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	32/M	CML	AMB	T/N	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	65/M	AML	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	27/K	mięsak	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	18/M	mięsak	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. minuta</i>	25/M		AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	17/M	AML	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	40/M	rak jądra	brak	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	8/M	ALL	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	18/M	ALL	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	31/M	syndrom krótkiego jelita	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	12/K	mięsak	AMB	T/N	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	69/M	chłoniak	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	44/M	AIDS, mięsak Kaposiego	AMB	T/N	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	14/M	mięsak	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	11/M	chłoniak	AMB	T/T	wyleczony	Kiehn 1992 [104]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	HIV(+), narkomania	FLZ, AMB	?	?	Polo 1993 [180]
<i>R. glutinis</i>	?	AML-2, przeszczep szpiku	?	?	?	Chao 1994 [40]
<i>Rhodotorula</i> sp.	13/M	zabieg neurochirurgiczny, abt	MCZ, 5FC	T/T	wyleczony	Marinova 1994 [140]
<i>R. glutinis</i>	?/M	AML, przeszczep szpiku, ŻPJ	AMB	T/	wyleczony	Sheu 1994 [216]
<i>R. minuta</i>	28/M	AIDS, nefropatia, profilaktyka FLZ	AMB	T/N	wyleczony	Goldani 1995 [79]
<i>R. mucilaginosa</i>	?/?	neutropenia	AMB	?	zmarł	Nucci 1995 [160]
<i>R. mucilaginosa</i>	?/?	AIDS	AMB	?	?	Walsh 1995 [239]
<i>R. mucilaginosa</i>	?/?	AIDS	AMB	?	?	Walsh 1995 [239]
<i>R. mucilaginosa</i>	?/?	AIDS	AMB	?	?	Walsh 1995 [239]
<i>R. glutinis</i>	11/M	ALL	?	?	zmarł	Colombo 1997 [49]
<i>R. glutinis</i>	13/K	ALL, neutropenia	AMB	T/N	wyleczony	Fanci 1997 [66]
<i>R. mucilaginosa</i>	50/M	AIDS, homoseksualizm, infekcje	AMB	T/T	wyleczony	Lui 1998 [136]
<i>R. mucilaginosa</i>	65/K	niedrożność jelita, sepsa, przetoka jelita, abt, ŻPJ, rak jelita	MCZ	?	zmarł	El-Tahavy 1999 [64]

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	57/M	rak odbyticy, anemia z niedoboru żelaza, ŻPJ	AMB	T/T	wyleczony	Papadogeorga kis 1999 [168]
<i>R. mucilaginosa</i>	3/K	nowotwór OUN, neurochirurgia, cht	brak	T/T	wyleczony	Alliot 2000 [2]
<i>R. glutinis</i>	46/M	chłoniak, cht, abt, profilaktyka FLZ	AMB	T	wyleczony	Alliot 2000 [2]
<i>R. mucilaginosa</i>	48/K	ostre zapalenie trzustki	FLZ	T	wyleczony	Cleary 2000 [47]
<i>R. mucilaginosa</i>	23/K	chłoniak niezziarniczny, cht, profilaktyka FLZ	brak	T/?	wyleczony	Kiraz 2000 [106]
<i>R. mucilaginosa</i>	55/M	przeszczep nerki, cukrzyca 2, immunosupresja	lipoAMB	?	wyleczony	Navarro 2001 [153]
<i>R. mucilaginosa</i>	21/K	chłoniak niezziarniczny, autologiczny przeszczep komórek progenitorowych profilaktyka FLZ i abt, ŻPJ	FLZ p. o., lipoAMB i. v.	T/T	wyleczony	Petrocheilou- Paschou 2001 [175]
<i>Rhodotorula</i> sp.	28/M	ALL, cht, abt, <i>Entoameba</i>	FLZ, AMB, ITR p. o.	T	?	Cure-Ruiz 2001 [51]
<i>R. mucilaginosa</i>	76/M	gruczolakorak jelita grubego, cht, neutropenia, abt	brak	N/N	wyleczony	Samonis 2001 [205]
<i>R. mucilaginosa</i>	64/M	abt, <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , AML, cht	AMB	T/T	zmarł	Chung 2002 [46]
<i>R. mucilaginosa</i>	15/K	AML, cht, profilaktyka FLZ	AMB	T/N	wyleczony	Chung 2002 [46]
<i>R. glutinis</i>	51/M	rak nosogardzieli, przerzuty do kości, abt	FLZ p. o., FLZ i. v.	T/T (po 17 d)	wyleczony	Hsueh 2003 [92]
<i>R. mucilaginosa</i>	34/M	młodzieńcze zapalenie stawów, zespół krótkiego jelita, ŻPJ, infekcja <i>Rhodotorula</i> w historii	FLZ lipoAMB	T/T	?	Lo Re III 2003 [133]
<i>R. mucilaginosa</i>	53/M	<i>endocarditis</i> paciorkowiec koagulazo(-), abt, -> przeszczep zastawki aortalnej	FLZ, AMB, ITZ	?	wyleczony	Maeder 2003 [138]
<i>R. mucilaginosa</i>	23/?	HIV(+), leki dożylnie	FLZ, AMB	T/N	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. glutinis</i>	7/?	glejak wielopostaciowy, ŻPJ, autologiczny przeszczep szpiku	AMB	T/N	?	Zaas 2003 [251]

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	43/?	ALL	brak	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	1 m/?	wrodzona wada serca, ŻPJ (immunokompetentny)	AMB	T/?	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	54/?	choroba Crohna, przeszczep nerki, ŻPJ	FLZ	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. glutinis</i>	29/?	zespół krótkiego jelita, ŻPJ (immunokompetentny)	FLZ	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	4/?	nerwiak płodowy	1 dawka AMB	T/N	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	32/?	gastropareza, ŻPJ (immunokompetentny)	FLZ	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	31/?	przeszczep płuc, mukowiscydoza	AMB	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>R. mucilaginosa</i>	35	anemia sierpowata (immunokompetentny)	FLZ, AMB	T/T	?	Zaas 2003 [251]
<i>Rhodotorula</i> sp.	10/K	ALL	AMB, 5FC	T/T	wyleczony	Pasqualloto 2005 [170]
<i>Rhodotorula</i> sp	16/K	AML	AMB, 5FC	T/N	wyleczony	Pasqualloto 2005 [170]
<i>Rhodotorula</i> sp.	16/K	mięsak Ewinga żuchwy	AMB, 5FC	T/T	wyleczony	Pasqualloto 2005 [170]
<i>R. mucilaginosa</i>	12/M	białaczka, kortykosteroidy, cht, abt	AMB	T/T	zmarł	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	16/K	białaczka, przeszczep szpiku, kortykosteroidy, cht, amt	AMB, 5FC	T/T	wyleczony	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	17/K	mięsak Ewinga, cht	AMB, 5FC	T/T	wyleczony	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	48/M	guz jelita, enterektomia, ŻPJ	brak	T/T	wyleczony	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	46/K	tłuszczakomięsak, cht, abt	brak	T/T	wyleczony	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	34/M	guz jądra, cht, abt, amt	FLZ	T/T	zmarł	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	18/M	białaczka, kortykosteroidy, cht, fuzarioza, abt	AMB, VRZ	T/T	zmarł	Lunardi 2006 [137]
<i>R. mucilaginosa</i>	0,5/K	noworodek, bakteriemia <i>E. coli</i> , profilaktyka FLZ	lipoAMB	T/T (po 13 d)	wyleczony	Perniola 2006 [174]

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Czynniki ryzyka	Terapia	Cewnik/ usunięcie	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	0,5/M	noworodek, bakteriemia <i>S. epidermidis</i>	lipoAMB	T/T (od razu)	wyleczony	Perniola 2006 [174]
<i>R. mucilaginosa</i>	0,5/K	noworodek, bakteriemia <i>E. coli</i> , profilaktyka FLZ	lipoAMB	T/T (po 15 d)	wyleczony	Perniola 2006 [174]
<i>R. mucilaginosa</i>	0,5/K	noworodek, profilaktyka FLZ	lipoAMB	T/T (po 3 d)	wyleczony	Perniola 2006 [174]
<i>R. glutinis</i>	64/M	sepsa MRSA, <i>Acinetobacter</i> , abt	FLZ i. v., FLZ p. o.	N/N	wyleczony	Kofteridis 2007 [108]
<i>R. glutinis</i>	65/M	pozaszpitalne zapalenie płuc, abt	FLZ i. v., FLZ p. o.	N/N	wyleczony	Kofteridis 2007 [108]
<i>R. mucilaginosa</i>	31/M	anemia sierpowata	FLZ p. o., VRZ p. o.	T/N	wyleczony	Neofytos 2007 [155]
<i>R. glutinis</i>	20/K	toczeń rumieniowaty	brak		zmarł	Pamidimukkal a 2007 [166]
<i>R. glutinis</i> + <i>C. glabrata</i>	54/M	przeszczep wątroby <i>hepatitis</i> HBV i nerki kłębuszkowe zapalenie nerek, CMV, zap. jelita <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> , abt, profilaktyka FLZ	MFG, VRZ i. v.,	T/T	zmarł	Riedel 2007 [192]
<i>R. mucilaginosa</i>	6/K	ŻPJ, abt	lipoAMB	T/T	wyleczony	Álvarez 2008 [4]
<i>R. mucilaginosa</i>		AML, profilaktyka FLZ	ITZ, AMB	T/T	wyleczony	Garcia-Suarez 2010 [73]

K – kobieta; **M** – mężczyzna; **T** – tak; **N** – nie; **ALL** – ostra białaczka limfatyczna; **AML** – ostra białaczka szpikowa; **CML** – przewlekła białaczka szpikowa; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **ŻPJ** – żywienie pozajelitowe; **abt** – antybiotykoterapia; **amt** – antymikotykoterapia; **cht** – chemioterapia; 5FC – 5-fluorocytozyna; **AMB** – amfoterycyna B; **FLZ** – flukonazol; **ITZ** – itrakonazol; **KTZ** – ketokonazol; **MCZ** – mikonazol; **MFG** – mikafungina; **VRZ** – worikonazol; **lipoAMB** – liposomalna postać AMB; **i. v.** – dożylnie; **p. o.** – doustnie

* Naveh i wsp. powołuje się na przypadek *endocarditis* opisany w pracy Cherubin i Neu 1971 [44], który nie został ujęty w tabeli.

Tabela 2.2: Przypadki zakażeń OUN wywołane przez *Rhodotorula* sp.

Gatunek	Pacjent lat/płeć	Czynnik ryzyka	Terapia	Zejście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	21/M	ALL	AMB	zmarł	Pore 1976 [181]
<i>R. mucilaginosa</i>	32/K	oponiak, operacja	5FC	wyleczony	Donald 1988 [62]
<i>R. mucilaginosa</i>	39/M	HIV(+)	5FC ITZ	wyleczony wyleczony	Gyaurgieva 1996 [84]
<i>R. mucilaginosa</i>	65/M	AIDS	MCZ	zmarł	Ahmed 1998 [1]
<i>R. mucilaginosa</i>	13/M	nerwiak płodowy	MCZ	wyleczony	Huttova 1998 [95]
<i>R. glutinis</i>	69/M	brak (wiek)	AMB i. v.	wyleczony	Lanzafame 2001 [123]
<i>R. mucilaginosa</i>	30/M	HIV(+)	AMB i. v. 5FC i. v.	zmarł	Thakur 2007 [229]
<i>R. mucilaginosa</i>	36/M	HIV(+)	AMB i. v., ITZ p. o.	wyleczony	Bardakur 2008 [11]
<i>R. glutinis</i>	35/M	HIV(+)	AMB	wyleczony	Shinde 2008 [217]
<i>R. mucilaginosa</i>	53/M	?	brak	zmarł	Elias 2009 [65]

K – kobieta; **M** – mężczyzna; **T** – tak; **N** – nie; **ALL** – ostra białaczka limfacyjna; **5FC** – 5-fluorocytosyna; **AMB** – amfoterycyna B; **ITZ** – itrakonazol; **MCZ** – mikonazol; **i. v.** – dożylnie; **p. o.** – doustnie

Tabela 2.3: Przypadki zapalenia otrzewnej w wyniku zakażenia *Rhodotorula* sp.

Gatunek	Pacjent lat/płeć	Czynnik ryzyka	Terapia	Usunięcie cewnika	Zejsście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	16/M	przewlekła NN, abt	AMB i. perit.	T	wyleczony	Eisenberg 1983 [63]
<i>R. mucilaginosa</i>	50/M	cukrzyca, abt	AMB i. perit.	T	wyleczony	Eisenberg 1983 [63]
<i>R. mucilaginosa</i>	59/M	brak, abt	AMB i. perit.	T	zmarł	Eisenberg 1983 [63]
<i>Rhodotorula</i> sp.	70/M	przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek, częste bakteryjne zap. otrzewnej z abt	5FC i. perit. (oporność) AMB i. perit. (oporność)	N	wyleczony	Honkanen 1983 [91]
<i>R. mucilaginosa</i>	31/M	terminalna postać NN	KTZ p. o., 5FC p. o.	N	wyleczony	Lueng 1983 [127]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	?	?	?	?	Benevent 1985 [16]
<i>R. glutinis</i>	47/M	przewlekła NN	5FC	T	wyleczony	Wood 1985 [246]
<i>R. mucilaginosa</i>	dziecko	?	?	?	?	Wong 1988 [245]
<i>R. minuta</i>	50/K	mocznica, obustronna marskość nerek, abt	AMB i. perit.	N	wyleczony	Lee 1995 [124]
<i>R. mucilaginosa</i>	37/K	HIV(+), przewlekła NN	AMB i. v.	T	wyleczony	Pennington 1995 [173]
<i>R. glutinis</i> + <i>C. parapsilosis</i>	50/M	7 lat ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa	FLZ, 5FC i. v. AMB i. v.	T	wyleczony	Asim 1999 [9]
<i>R. mucilaginosa</i>	69/M	NN z powodu glomerulopatii, przeziurawienie worka dializacyjnego	KTZ p. o.	N	wyleczony	de Zoysa 2001 [59]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	?	?	?	?	Bibashi 2003 [17]
<i>R. mucilaginosa</i>	nowo- rodek	bezdech noworodkowy	?	?	?	Hong 2003 [90]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	?	?	T	?	Chen 2004 [41]
<i>R. mucilaginosa</i>	4/K	terminalna postać NN	FLZ AMB	T	wyleczony	Soylu 2004 [223]
<i>R. mucilaginosa</i>	69/M	terminalna postać NN, wtórna do nefropatii cukrzycowej	FLZ i. perit. AMB i. v.	T	wyleczony	Sequeira 2005 [214]
<i>Rhodotorula</i> sp.	62/M	przeszczep wątroby z powodu HCV	AMB, lipoAMB	T	zmarł	Alothman 2006 [3]

Gatunek	Pacjent lat/płeć	Czynnik ryzyka	Terapia	Usunięcie cewnika	Zejsście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. mucilaginosa</i>	3,3/M	abt,	FLZ p. o., 5FC i. perit., KTZ i. perit.	T	wyleczony	Raaijmakers [185]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	cukrzyca, przewlekła NN	AMB i. v.	T	?	Rosa 2007 [197]
<i>R. mucilaginosa</i>	?	?	?	?	?	Ünal 2009 [235]

M – mężczyzna; **F** – kobieta; **T** – tak; **N** – nie; **NN** – niewydolność nerek; **5FC** – 5-fluorocytozyna; **AMB** – amfoterycyna B; **FLZ** – flukonazol; **KTZ** – ketokonazol; **abt** – antybiotykoterapia; **lipoAMB** – liposomalna postać AMB; **i. v.** – dożylnie; **p. o.** - doustnie; **i. perit.** – dootrzewnowo

Tabela 2.4: Zakażenia oka wywołane *Rhodotorula* sp.

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Jednostka chorobowa	Czynnik ryzyka	Terapia	Zejsście	Pozycja piśmiennictwa
<i>Rhodotorula</i> sp.	?	<i>keratitis</i>	?	keratoplastyka	wyleczony	Wawer 1965 [242]
<i>R. mucilaginosa</i>	29/K	<i>keratitis</i>	brak	AMB m., NYS	wyleczony	Romano 1973 [196]
<i>R. mucilaginosa</i>	29/M	<i>keratitis</i>	brak	NYS m., AMB m., NYS p. o.	wyleczony	Segal 1975 [212]
<i>R. glutinis</i>	40/M	<i>keratitis</i>	uraz oka, abt, amt	przeszczep rogówki, AMB m., AMB sys., 5FC	wyleczony	Casolari 1992 [37]
<i>R. minuta</i>	71/K	<i>endophthalmitis</i>	operacja z powodu AMD	KET	witrektomia	Gregory 1992 [82]
<i>R. glutinis</i>	40/M	<i>keratitis</i>	uraz oka, zapalenie, abt, amt (5FC i AMB)	przeszczep rogówki, leki miejscowe	wyleczony	Guerra 1992 [83]
<i>R. mucilaginosa</i>	50/M	<i>dacryocystitis</i> (<i>keratitis</i>)	brak, zapalenie woreczka łzowego, uraz oka	MCZ, NTM	wycięcie woreczka łzowego	Muralidhar 1995 [151]
<i>Rhodotorula</i> sp.	55/M	<i>keratitis</i>	przeszczep rogówki	NTM m., AMB m.	usunięcie przeszczepu	Panda 1999 [167]
<i>R. minuta</i> + <i>C. albicans</i>	27/M	<i>endophthalmitis</i>	HCV, leki	AMB i. vitr. KET p. o.	witrektomia	Pinna 2001 [179]
<i>R. mucilaginosa</i>	26/M	<i>endophthalmitis</i>	HIV(+), AIDS	AMB i. v. AMB i. vitr.	usunięcie oka	Merkur 2002 [147]
<i>Rhodotorula</i> sp.	63/K	<i>keratitis</i>	brak	AMB m.	wyleczony	Bawazeer 2003 [15]
<i>R. mucilaginosa</i>	78/M	<i>keratitis</i>	przeszczep rogówki	AMB sys. i m.	wyleczony	Lisfitz 2005 [130]

K – kobieta; **M** – mężczyzna; **T** – tak; **N** – nie; **AMD** – zwyrodnieni plamki żółtej związane z wiekiem; **5FC** – 5-fluorocytozyna; **AMB** – amfoterycyna B; **MCZ** – mikonazol; **NTM** – natamycyna; **NYS** – nystatyna; **abt** – antybiotykoterapia; **amt** – antymikotykoterapia; **i. vitr.** – do ciała szklatego; **m.** – miejscowo; **p. o.** – doustnie; **sys.** – systemowo

Tabela 2.5: Inne zakażenia wywołane *Rhodotorula* sp*.

Gatunek	Pacjent wiek/płeć	Jednostka chorobowa	Czynnik ryzyka	Terapia	Zejsście	Pozycja piśmiennictwa
<i>R. glutinis</i>	24/K	wodniak jajowodu	poronienia, zapalenie sromu i pochwy	?	?	Gogate 1987 [77]
<i>R. mucilaginosa</i>	32/M	zmiana skórna w pachwinie	HIV+	NYS m.	wyleczony	da Silva 2001 [54]
<i>R. minuta</i>		zakażenie protezy stawu biodrowego	artroplastyka	AMB	wyleczony	Cutrona 2002 [52]
<i>R. minuta</i>	60/K	zakażenie stawu biodrowego	cukrzyca, rak macicy w wywiadzie, zakażenie stawu <i>C. albicans</i> oraz bakteryjne, abt, ateroplastyka	FLZ	wyleczony	Cerikcioglu 2005 [38]
<i>R. mucilaginosa</i>	45/M	owrzodzenia jamy ustnej	AIDS	ITR	wyleczony	Kaur 2007 [103]
<i>R. mucilaginosa</i>		zakażenie kości udowej, <i>osteomyelitis</i>	niezrastające się złamanie kości udowej, abt, zlekceważenie etiologicznej roli <i>Rhodotorula</i>	AMB i. v.	wyleczony	Goyal 2008 [80]
<i>R. mucilaginosa</i>	41/K	zakażenie protezy kości udowej	HIV(+) wypadek, złamanie kości udowej wszczepienie implantu	lipoAMB B	wyleczony	Savini 2008 [208]
<i>R. mucilaginosa</i>	57/M	grzybica paznokci	brak	?	?	da Cunha 2009 [53]
<i>R. mucilaginosa</i>	?/M	zapalenie stawu biodrowego, zapalenie szpiku	brak	?	?	Bush 2009 [29]
<i>R. mucilaginosa</i>	46/M	<i>lymphoadenitis</i>	AIDS, przebyte <i>Toxoplasma</i> <i>encephalitis</i>	ITR p. o.	wyleczony	Fung 2009 [69]

K – kobieta; **M** – mężczyzna; **T** – tak; **N** – nie; **AMB** – amfoterycyna B; **FLZ** – flukonazol; **ITR** – itrakonazol; **NYS** – nystatyna; **abt** – antybiotykoterapia; **lipoAMB** – liposomalna AMB; **i. v.** – dożylnie; **m.** – miejscowo; **p. o.** – doustnie

* istnieje opis *oesophagitis* wywołanego przez *R. mucilaginosa* [250], opis gruźlicy kości z koinfekcją *R. minuta* [230], a także zapalenia pęcherzyków płucnych [218]. Jednakże ze względu na to, że autor nie dotarł do szczegółów tych przypadków, nie zostały one umieszczone w tabeli.

2.3 Biotypowanie

W literaturze tematu znaleźć można wiele metod typowania szczepów drożdży (głównie *C. albicans*). Są to metody oparte na morfotypie kolonii, oporności na różne substancje chemiczne, enzymogramach i auksanogramach, a także bardziej zaawansowane techniki typowania genetycznego tzw. metody PCR-fingerprinting.

Najprostszym sposobem typowania szczepów drożdży jest **morfotypowanie**. Polega ono na ocenie wyglądu kolonii na podłożu MEA. Oceniany jest ich brzeg i powierzchnia [176, 94]. Metoda pomimo prostoty cechuje się wysokim wskaźnikiem różnicowania (dyskryminacji) [76, 164].

Jedną z najwcześniej wprowadzonych metod fenotypowania drożdży jest **serotypowanie** oparte na metodzie aglutynacji. Serotypowanie zostało opracowane najlepiej dla *C. neoformans* i *C. albicans*, jednak nie pozwala na dokładne rozróżnienie szczepów w celach epidemiologicznych [222].

W typowaniu opartym o **auksanogram** wykorzystuje się wewnątrzgatunkowe różnice w zdolności do asymilacji różnych związków organicznych. W zależności od zastosowanych związków są różne wariacje tej metody. Dostatecznie popularne jest typowanie szczepów *C. albicans* na podstawie auksanogramów testu API 20C AUX (bioMérieux) [28, 118, 244]

Rezystogramy, czyli profile wrażliwości szczepów drożdży na różnego rodzaju związki zapoczątkowane zostały pracą Warnocka i wsp. [240]. Wykorzystał on do typowania szczepów *C. albicans* między innymi zieleń malachitową, kwas borowy i siarczan miedzi. Typowanie w oparciu o rezystogramy wykorzystywane było z licznymi modyfikacjami przez szereg autorów [28, 93, 162].

Kolejnym sposobem typowania jest, najbardziej rozpowszechniony w badaniach polskich naukowców, sposób różnicowania szczepów na podstawie **enzymogramów** testu API ZYM firmy BioMérieux [195]. Metoda została rozpowszechniona przez Williamsona i wsp., którzy dla *C. albicans* stwierdzili 8 biotypów (A, B, C, D, E, F, G, H) na podstawie aktywności pięciu z 19 dostępnych w teście enzymów: esterazy, aryamidazy walinowej, fosfohydrolazy naftolowej, α -glukozydazy i N-acetylo- β -glukozyloamidazy [243]. W badaniach na większej ilości szczepów Kurnatowska i Kurnatowski rozszerzyli

klasyfikację o kolejne biotypy I-N [117], a następnie Krajewska-Kułak dodała do istniejących kolejne oznaczone literami O-T [109].

Metoda biotypowania w oparciu o enzymogramy została również zastosowana przez Ruiz-Aragon i wsp. dla szczepów *R. glutinis*. Dokonali oni podziału szczepów ze względu na aktywność enzymów testu API ZYM: aryamidazy cystyny, β -glukozydazy, N-acetylo- β -glukozyloaminidazy [200].

Oprócz opisanych powyżej metod fenotypowania szczepów drożdży istnieją techniki oparte na analizie DNA – genotypowanie. Poniżej przedstawiono najpowszechniejsze metody z uwzględnieniem wykorzystania ich dla szczepów *Rhodotorula* sp.

Elektroforeza w pulsacyjnym polu elektrycznym (**PFGE**, pulsed field gel electrophoresis) jest to metoda elektroforetycznego kariotypowania. Rozdział elektroforetyczny DNA jądrowego następuje w zmiennych, pulsujących, prostopadłych do siebie polach elektrycznych. W czasie rozdziału cząsteczki DNA zmieniają położenie w zależności od orientacji pola. Cząsteczki, których czas zmiany orientacji jest dłuższy od trwania impulsu elektrycznego, rozdzielają się według masy. Metoda ta została wykorzystana do kariotypowania klinicznych szczepów *R. mucilaginosa*. Okazała się zgodna z typowaniem RAPD i auksanogramem, jednakże mała ilość przebadanych szczepów (6 izolatów) nie pozwala na uogólnienie tej obserwacji [207]. Wadami tej metody są kłopotliwe przygotowywanie próbek, długi czas wykonywania oraz jej wysoki koszt [222].

Jedną z metod badania „genetycznych odcisków palców” (DNA-fingerprinting) jest technika analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych – **RFLP** (Restriction fragment length polymorphism). Pokróćce polega ona na wyizolowaniu DNA ze sferoplastów*, pocięciu go na fragmenty przez jedną lub kilka endonukleaz i rozdziale elektroforetycznym powstałych fragmentów na żelu agarozowym. Metoda ta była wykorzystywana do typowania szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, *Cr. neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* oraz wielu innych [241, 222].

Najbardziej popularną w typowaniu patogennych grzybów jest metoda **RAPD** (Randomly Amplified Polimorphic DNA – losowa amplifikacja polimorficznego DNA) [193, 222]. Metoda polega na użyciu krótkiego startera przyłączającego się w losowych

* Sferoplast – komórka, z której została usunięta ściana komórkowa. W przypadku grzybów najczęściej poprzez działanie zymolazy.

miejscach analizowanego DNA. Po zakończeniu reakcji dokonuje się rozdziału elektroforetycznego powielonych fragmentów, uzyskując wzór prążków specyficzny dla danego szczepu. RAPD zostało użyte przez Hsueh i wsp. [92] w celu wykazania identyczności szczepów *R. glutinis* izolowanych od pacjenta z fungemią wywołaną przez ten grzyb oraz przez Saracli i wsp. [207] jako metoda referencyjna dla typowania metodą PFGE.

2.4 Determinanty patogenności grzybów chorobotwórczych

Mianem determinant patogenności określano cechy, które wyznaczają zdolność mikroorganizmu do wywoływania choroby, ale same w sobie nie są wymagane do jego żywotności [247]. Henderson i wsp. definiują determinanty patogenności jako składowe patogenów, które powodują uszkodzenie w organizmie gospodarza*; mogą tu być włączane czynniki życiowo ważne dla drobnoustrojów [89]. Definicje te nie uwzględniają jednak roli podatności gospodarza na zakażenie, wskazując, że odpowiedzialne za rozwój choroby są tylko właściwości patogenu. Według tych definicji patogenami są tylko te organizmy, które wywołują choroby u zdrowych osób, a nie są patogenami mikroorganizmy oportunistyczne, czy też komensaliczne, które są zdolne tylko do zakażenia gospodarza z zaburzeniami układu odpornościowego.

Casadevall i Pirofski [35] zaproponowali nową definicję patogenności i determinant patogenności dla mikroorganizmów uwzględniającą stan obrony immunologicznej gospodarza. Patogenność danego mikroorganizmu została wyrażona jako wielkość uszkodzeń, jakie powodowane są przez sam drobnoustrój oraz układ odpornościowy w odpowiedzi na patogen. Wyróżnili 6 klas patogenów:

* Uszkodzenia w organizmie gospodarza w tym przypadku są szerokim pojęciem obejmującym zmiany wywołane przez zakażenie mogące dotyczyć komórek, tkanek oraz organów. Uszkodzenia na poziomie komórkowym obejmują nekrozę, apoptozę i transformacje nowotworową. Uszkodzenia na poziomie tkanek i organów obejmują zapalenie ziarniniakowe, zwłóknienie w następstwie przewlekłego zapalenia i guzy [35].

Klasa I: mikroorganizmy, które powodują uszkodzenia tylko w sytuacji słabej odpowiedzi immunologicznej – powszechnie określane jako oportunistyczne lub komensaliczne, niepowodujące uszkodzeń w organizmach z niezaburzoną odpowiedzią immunologiczną np. *Pneumocystis jirovecii* – uszkodzenia związane są z odpowiedzią gospodarza, czy *Pseudallescheria boydii* – uszkodzenie związane głównie ze wzrostem patogenu w tkankach gospodarza.

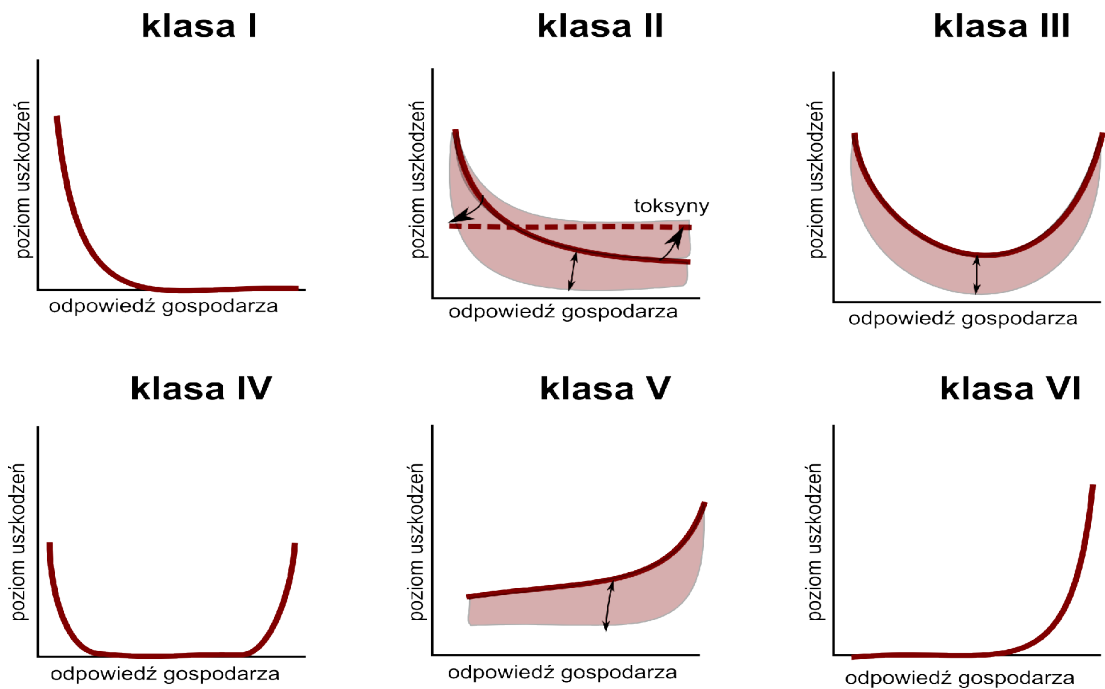
Klasa II: mikroorganizmy, które powodują uszkodzenia zarówno u pacjentów z obniżoną odpornością, jak i w warunkach normalnej odpowiedzi immunologicznej, przy czym w przypadku obniżonej odporności zakażenia występują częściej np. *C. albicans*, *Cr. neoformans*.

Klasa III: mikroorganizmy, które powodują uszkodzenia zarówno przy osłabionej, jak i normalnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Przy czym w obu przypadkach postać zakażenia jest podobna, co odróżnia te klasę od klasy II. Przykładem jest tu *Histoplasma capsulatum*.

Klasa IV: mikroorganizmy, które powodują większe uszkodzenia w ekstremach odpowiedzi immunologicznej, to znaczy w przypadku osłabionej odporności lub w przypadku nadreaktywności układu immunologicznego. Przykładem jest tutaj *Aspergillus fumigatus*.

Klasa V: mikroorganizmy, które powodują uszkodzenia w każdym stanie układu odporności, ale największe w przypadku nadreaktywności układu immunologicznego gospodarza. Przykładem są zakażenia *Shigella* sp. i *Campylobacter* sp., które są najczęściej chorobami niepowodującymi stałych zmian, ale w przypadku wzmożonej odpowiedzi immunologicznej może rozwinąć się w ich następstwie syndrom Reitera.

Klasa VI: mikroorganizmy, które powodują uszkodzenia tylko w przypadku silnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Jest to klasa teoretyczna. Najbliżej spełnienia jej kryteriów jest *Helicobacter pylori*. Zakażenie tym gatunkiem u większości osób jest asymptomatyczne, jednak u niektórych prowadzi do rozwinięcia się wrzodów i w konsekwencji do nowotworzenia.



Rycina 2.5: Klasy patogenności mikroorganizmów.

Patogenność przedstawiona jako funkcja poziomu uszkodzeń i odpowiedzi immunologicznej gospodarza - na podstawie pracy Casadevall i Pirofski [35].

Dla patogenów grzybiczych stan obrony immunologicznej gospodarza jest główną determinantą decydującą o przebiegu i wyleczeniu grzybicy [35]. Wszystkie chorobotwórcze grzyby są pasożytami fakultatywnymi (okolicznościowymi), tzn., że do rozmnażania i wzrostu nie wymagają obecności gospodarza. Posiadają nisze ekologiczne zlokalizowane przeważnie w glebie albo na roślinach i utrzymują jednocześnie zdolność do infekowania zwierząt lub ludzi [36].

Określenie determinant patogenności mikroorganizmów z klasy I według przedstawionego powyżej podziału stanowi pewien problem interpretacyjny, gdyż wydaje się, że kluczową rolę w tych zakażeniach odgrywa kondycja gospodarza. Człowiek stanowi złożony ekosystem, w którym, w stanie fizjologii, panuje homeostaza w układzie grzyb – układ odporności. W przypadku zaburzenia tego układu, najczęściej poprzez niedobór odporności, rzadziej poprzez nadekspresję cech determinujących patogenność grzybów, dochodzi do rozwinięcia grzybicy. Są jednak grzyby, np. *Trichothecium roseum* oraz większość podstawczaków, które bytują w środowisku człowieka, ale nigdy nie były opisywane jako patogeny, nawet u pacjentów z upośledzonym układem odporności. Sugeruje to, że nawet patogeny o małej wirulencji, muszą posiadać minimalny zestaw cech

determinujących ich patogenność, który pozwala im na wnikanie i namnażanie się w ciele gospodarza.

Nie ma badań na temat determinant patogenności *Rhodotorula*. Jednakże niniejszą pracę można wpisać w szersze ramy badań nad determinantami patogenności grzybów oportunistycznych przedstawionych m.in. w pracach Pedroso i wsp. nad cechami gatunków z rodzaju *Cryptococcus* innych niż *Cr. neoformans/gatti* [171, 172], pracach na temat patogennych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* [48, 144, 143], a także w pracy porównującej patogeniczne i saprofityczne szczepy *Trichoderma longibrachiatum* [8].

Istnieje kilka typów determinant patogenności. Są to między innymi egzotoksyny, moduliny odpowiedzialne za wywołanie odpowiedzi zapalnej, enzymy – szczególnie enzymy mające aktywność wobec związków występujących w organizmie gospodarza: proteazy, neurominidazy i fosfolipazy, a także ureaza, adhezyny, zdolność do ruchu, tworzenie otoczek, zdolność inaktywowania układu dopełniacza, niektóre barwniki np. melanina, pyocyjanina, mechanizmy indukujące apoptozę, zdolność tworzenia biofilmu, przyswajanie żelaza, zdolność do przeżywania w komórkach gospodarza. Za determinantę patogenności można również uznać zdolność do przeżywania w temperaturze ciała gospodarza, czy przejście z fazy drożdżowej do mycelialnej u grzybów dimorficznych [34].

U *C. albicans* patogenność związana jest przede wszystkim z adhezynami pozwalającymi na przyleganie komórek drożdży do komórek gospodarza, zdolnością do zmiany morfologii (ang. phenotype switching) z fazy pojedynczych komórek drożdży do postaci strzępkowej, wydzielanie proteazy aspartylowej i fosfolipaz [32]. U *Cr. neoformans* jako czynniki determinujące patogenność wymienia się: wytworzenie polisacharydowej otoczki, wytwarzanie melaniny, wzrost w temperaturze 37°C oraz produkcję egzoenzymów takich jak proteinazy i fosfolipazy [33].

W przypadku gatunków *Rhodotorula* można pośrednio, poprzez analogię z grzybami o potwierdzonej chorobotwórczości, wnioskować o niektórych cechach determinujących ich patogenność. W niniejszej pracy oceniono determinanty patogenności, które najprawdopodobniej są odpowiedzialne za zdolność *Rhodotorula* do powodowania uszkodzeń w organizmie gospodarza.

3 CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy jest próba znalezienia odpowiedzi na pytanie, jakie cechy posiada *Rhodotorula* sp. pozwalające na wywołanie zakażeń. A także, dlaczego pomimo powszechności występowania *Rhodotorula* w środowisku człowieka, grzyb ten jest sporadycznie odpowiedzialny za infekcje.

W celu pełniejszego poznania natury zakażeń *Rhodotorula* podjęta została próba odpowiedzi na następujące problemy:

- 1) Jaki gatunek dominuje w zakażeniach i w ontocenozie człowieka?
- 2) Jakie i z jaką częstością z wybranych determinant patogenności występują u drożdży *Rhodotorula*?
- 3) W jakim stopniu *Rhodotorula* sp. różni się od *C. albicans* w „ekspresji” determinant patogenności?

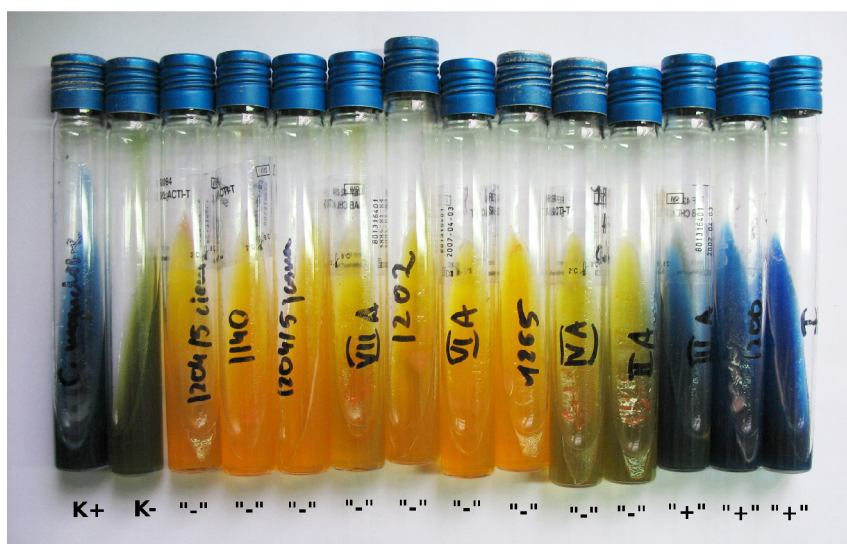
4 MATERIAŁ I METODY

4.1 Badane szczepy

Do badań wykorzystano szczepy *Rhodotorula* sp. izolowane od pacjentów oraz z próbek ze środowiska badanych w Zakładzie Mykologii UJ-CM w okresie od października 2007 do stycznia 2010. Za grupę kontrolną posłużyły szczepy *Candida albicans* pochodzące z tego samego źródła.

4.1.1 Izolacja i identyfikacja

Grzyby były izolowane na standardowym podłożu SGA z chloramfenikolem. Identyfikacji dokonywano na podstawie cech morfologicznych kolonii i komórek, a także na podstawie zdolności do asymilacji określonych związków węglowych (test API 20C AUX). Dodatkowo wykonywano test zdolności do asymilacji azotanów, w celu różnicowania gatunków *R. glutinis* i *R. mucilaginosa*.



Rycina 4.1: Wynik testu asymilacji azotanów dla przykładowych szczepów *Rhodotorula*.

K+ - kontrola dodatnia z *Candida magnoliae*, K- - kontrola ujemna niezaszczepiony skos, "-" - szczepy nieasymilujące azotanów, "+" - szczepy asymilujące azotany.

4.1.2 Przechowywanie szczepów

Szczepy przechowywano w temperaturze 4°C, okresowo przesiewając na odpowiednie podłoża.

4.1.3 Biotypowanie

Typowanie enzymatyczne wykonane zostało na podstawie uzyskanych profili enzymatycznych w teście API ZYM (por. rozdział: 4.3.1 Aktywność enzymów hydrolitycznych). W celu znalezienia podobieństw uzyskanych profili posłużono się statystyczną metodą klasteryzacji.

4.2 *Badanie tolerancji temperatury*

W celu określenia zdolności do przeżycia i wzrostu w temperaturze ciała człowieka badanych szczepów:

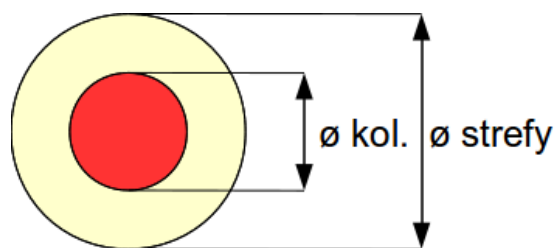
- 1) Przygotowywano zawiesinę drożdży o gęstości 1 w skali McFarlanda;
- 2) 5 µl zawiesiny zaszczipiano 3 ml podłoża YNB i 1 ml surowicy bydlęcej;
- 3) Podłoża inkubowano przez 5 dni w temperaturze 37°C;
- 4) Oceniano wzrost poprzez pomiar gęstości (nefelometrycznie - gęstościomierzem) oraz poprzez wysianie na podłoże stałe i określenie ilości wyrosłych kolonii (określenie liczby cfu/ml).

4.3 Aktywność enzymatyczna

Do oznaczenia aktywności enzymów na podłożach stałych obliczany był współczynnik średnicy kolonii do średnicy powstałej w wyniku działania enzymu strefy precypitacji/przejaśnienia według poniższego wzoru:

$$Pz = \frac{\varnothing \text{ kolonii}}{\varnothing \text{ strefy}}$$

Jak można zauważyć wyższe wartości współczynnika oznaczają mniejszą aktywność enzymu.



Rycina 4.2: Sposób wyznaczania wartości Pz.

Wartość Pz wyznacza się w oparciu o wyniki pomiaru średnicy strefy precypitacji/przejaśnienia i średnicy kolonii [182].

4.3.1 Aktywność enzymów hydrolitycznych testu API ZYM

Aktywności enzymów hydrolitycznych oznaczona została przy użyciu testu paskowego API ZYM firmy bioMérieux. Zawarte w teście enzymy przedstawiono w tabeli 4.1.

- 1) Szczepy wstępnie hodowano na podłożu SGA przez 3 dni w temperaturze 27°C.
- 2) Sporządzano zawiesinę o gęstości 5 w skali McFarlanda.
- 3) Nakładano po 65 µl zawiesiny do każdego dołka testu.
- 4) Po nakropieniu inkubowano test przez 4 godziny w 37°C.

- 5) Do każdego dołka dodano po kropli odczynnika ZYM A.
- 6) Do każdego dołka dodano po kropli odczynnika ZYM B.
- 7) Odczytu dokonywano wizualnie, w razie potrzeby naświetlając paski.
- 8) Wyniki przedstawiano w 6 punktowej skali (0 - 5) w zależności od intensywności reakcji.

Tabela 4.1: Enzymy i ich substraty w teście API ZYM firmy BioMérieux

Oznaczenie	Enzym badany	Substrat
e1	kontrola ujemna	brak
e2	fosfataza zasadowa	2-naftylofosforan
e3	esteraza (C4)	2-naftylomaślan
e4	lipaza-esteraza(C8)	2-naftylokapronian
e5	lipaza (C14)	2-naftylomirystylan
e6	arylamidaza leucyny	L-leucylo-2-naftyloamid
e7	arylamidaza waliny	L-walinylo-2-naftyloamid
e8	arylamidaza cystyny	L-cystynylo-2-naftyloamid
e9	trypsyna	N-benzylo-DL-arginino-2-naftyloamid
e10	chymotrypsyna	N-glutarylo-fenylalanino-2-naftyloamid
e11	fosfataza kwaśna	2-naftylofosforan
e12	fosfohydrolaza naftolu	fosforan-AS-BI-naftolu
e13	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α -D-galaktopiranoza
e14	β -galaktozydaza	2-naftylo- β -D-glukopiranoza
e15	β -glukoronidaza	Naftolu-AS-BI- β -D-glukoronid
e16	α -glukozydaza	2-naftylo- α -D-glukopiranoza
e17	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β -glukopiranoza
e18	N-acetylo- β -glukozyloamidaza	1-naftylo-N-acetylo- β -D-glukozyloamid
e19	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α -D-mannopiranoza
e20	α -fukozydaza	2-naftylo- α -L-fukopiranoza

4.3.2 Aktywność fosfolipazy

Aktywność fosfolipazy oznaczona została metodą według Price i wsp. [182] z modyfikacją Samaranyake i wsp. [204]:

- 1) Szczepy były wstępnie hodowane na podłożu SGA z chloramfenikolem.
- 2) Z tych szczepów sporządzono zawiesiny o gęstości 1 w skali McFarlanda ($1-2 \times 10^6$ cfu/ μ l).
- 3) 1 μ l zawiesiny наносzono punktowo na podłoże EYA w dwóch powtórzeniach.
- 4) Płytki inkubowano w odwróconej pozycji przez 10 dni w temperaturze 27 i 37° C.
- 5) Odczytu dokonywano poprzez pomiar średnicy precypitacji i średnicy kolonii. Wyniki wyrażone zostały współczynnikiem $P_z = \frac{\text{średnica kolonii}}{\text{średnica precypitacji}}$ wraz ze średnicą kolonii.

Zasada metody oparta jest na inkorporacji do podłoża żółtka, które zawiera dużą ilość fosfolipidów i fosfatydyloetanolaminę. W czasie wzrostu szczepy wykazujące aktywność fosfolipolityczną tworzą wyraźną białą strefę wokół kolonii (por. rycina 5.14). Pojawianie się strefy jest spowodowane najprawdopodobniej powstawaniem kompleksów – mydeł – kwasów tłuszczowych uwolnionych działaniem fosfolipazy z wapniem zawartym w podłożu [75].

4.3.3 Aktywność proteinyzy

Aktywność proteinyzy kwaśnej badano metodą według Staiba [226] z modyfikacjami.

- 1) Sporządzano zawiesiną z 3-5 dniowych kolonii drożdży o gęstości 1 w skali McFarlanda.
- 2) 1 μ l zawiesiny nakładano punktowo na podłoże BSAA w dwóch powtórzeniach.
- 3) Zaszczepione płytki inkubowano w odwróconej pozycji przez 10 dni w temperaturze 27 i 37°C.
- 4) Po inkubacji płytki utrwalano 20% TCA przez 20 min.

- 5) Po wyschnięciu płytek dokonywano pomiaru strefy przejaśnienia.
- 6) Wyniki zapisywano w postaci stosunku średnicy kolonii do średnicy przejaśnienia (wartość P_z).

Do podłoża inkorporowana jest albumina bydlęca. Wzrastające szczepy poprzez działanie proteiny trawia białko, przez co powstaje wokół kolonii strefa przejaśnienia. Lepsze uwidocznienie strefy dokonuje się poprzez denaturację niestrawionego białka w podłożu za pomocą kwasu trichlorooctowego (TCA). Dodatkowo można wybarwić płytki czernią amidową lub błękitem Comassiego.

4.3.4 Aktywność lipazy

W badaniu aktywności lipazy wykorzystano podłoże z mieszaniną równej objętości estrów polioksyetylenu i wyższych kwasów tłuszczowych – polisorbatów dostępnych pod komercyjną nazwą Tween. Były to: ester polioksyetylenu sorbitanowego kwasu tłuszczowego laurowego (polisorbát 20, Tween 20), ester polioksyetylenu sorbitanowego kwasu tłuszczowego palmitynowego (polisorbát 40, Tween 40), ester polioksyetylenu sorbitanowego kwasu tłuszczowego monostearynowego (polisorbát 60, Tween 60), ester polioksyetylenu sorbitanowego kwasu tłuszczowego oleinowego (polisorbát 80, Tween 80). Podłoże to pozwala na określenie aktywności acylhydrolazy (lipazy) triacyloglicerolu. Wykonanie oznaczenia przedstawia się następująco:

- 1) Szczepy były wstępnie hodowane na podłożu SGA z chloramfenikolem.
- 2) Z tych szczepów sporządzono zawiesiny o gęstości 1 McFarlanda.
- 3) 1 μ l zawiesiny наносono punktowo na podłoże z mieszaniną Tweenów w dwóch powtórzeniach.
- 4) Płytki inkubowano w odwróconej pozycji przez 10 dni w temperaturze 27 i 37°C.
- 5) Odczytu dokonywano poprzez pomiar średnicy precypitacji i średnicy kolonii. Wyniki wyrażone zostały współczynnikiem $P_z = \text{średnica kolonii} / \text{średnica precypitacji}$ wraz ze średnicą kolonii.

Uwolnione w wyniku działania enzymu kwasy tłuszczowe tworzą kompleksy z zawartym w podłożu jonami wapnia. Wytrącają się sole (mydła) w postaci strefy precypitacji wokół kolonii.

4.4 Ocena występowania dimorfizmu drożdżowo-mycelialnego

Zdolność występowania grzybów z rodzaju *Rhodotorula* w dwóch postaciach: drożdżowej i strzępkowej oceniano w surowicy krwi bydlęcej. W tym celu:

- 1) Grzyby wstępnie hodowano na podłożu SGA.
- 2) Sporządzano zawiesinę o gęstości 1 w skali McFarlanda.
- 3) 5 µl zawiesiny przenoszono do probówek z 1 ml surowicy bydlęcej.
- 4) Zaszczepioną surowicę inkubowano przez 5 dni.
- 5) Komórki zbierano poprzez wirowanie i dekantację supernatantu.
- 6) Powstały osad wytrząsano z resztką niezlanej surowicy.
- 7) Sporządzano preparat niebarwiony – oceniano występowanie form strzępkowych.

4.5 Tworzenie otoczek

W celu stwierdzenia tworzenia otoczek szczepy *Rhodotorula* sp. hodowano w specjalnych podłożach indukujących tworzenie otoczek według metod podanych przez Zaragoza i Casadevall [252].

- 1) Szczepy wstępnie hodowano na podłożu SGA przez 3-5 dni.
- 2) Z hodowli pobierano oczko ezy i zaszczepiano odpowiednie podłoże:
 - a) LIM,
 - b) dziesięciokrotnie rozcieńczone SGB,
 - c) surowicę bydlęcą,

- 3) Podłoża inkubowano przez 7 dni w temperaturze 27°C.
- 4) Okresowo wykonywano preparat negatywowy w tuszu chińskim w celu stwierdzenia obecności otoczek.

4.6 Ocena zdolności tworzenia biofilmu

Do oceny zdolności tworzenia biofilmu wykorzystano metodę opracowaną na podstawie prac Jin i wsp. oraz Li i wsp. [100, 128]

Przygotowanie szczepów:

- 1) Grzyby wstępnie hodowano na SGA przez 3-5 dni w temperaturze pokojowej.
- 2) Oczko ezy aktywnie wzrastających komórek przenoszono do bulionu YNB z 100 mmol glukozy i inkubowano przez 48h w temperaturze 27°C.
- 3) Po inkubacji komórki były oczyszczane 0,5 ml PBS przez dwukrotne wytrząsanie i wirowanie przy 5000 g przez 5 min.
- 4) Przemyte komórki zawieszano w 1 ml bulionu YNB i ustalano gęstość 3 w skali McFarlanda. Zawiesina posłużyła do dalszej części eksperymentu.

Biofilm - faza przylegania (wykonywane na polistyrenowych jałowych, 96-dołkowych, płaskodennych płytkach titracyjnych):

- 5) 100µl zawiesiny wyjściowej badanych szczepów dodawano do każdego dołka w trzech powtórzeniach, jako kontrola stosowane było podłoże YNB.
- 6) Płytki inkubowano przez 90 min w 37°C na wytrząsarce orbitalnej przy 75 obr./min.

Biofilm - faza wytwarzania biofilmu:

- 7) Odciągnięto podłoże i przemywano dołki dwukrotnie 150 µl PBS.
- 8) Dodano 100 µl świeżego YNB z 100 mmol glukozy do każdego dołka.
- 9) Płytki zaklejano parafilmem i inkubowano przez 48-72h w 37°C na wytrząsarce orbitalnej (75 obr./min).

- 10) Po wytworzeniu biofilmu odpłukano komórki planktoniczne poprzez odcignięcie podłoża i dwukrotne przemycie 200 μ l PBS

Barwienie:

- 11) Płytki suszono na powietrzu przez 45 min.
- 12) Do każdego dołka dodawano po 100 μ l 0,4% wodnego roztworu fioletu krystalicznego i inkubowano przez 45 min 37°C.
- 13) Roztwór barwnika odciągano i kilkakrotnie przepłukiwano dołki PBS.
- 14) Dodawano 150 μ l 95% etanolu do każdego dołka i odbarwiano przez 45 min.
- 15) Przenoszono po 100 μ l do dołków nowej płytki i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda=570$ (595) nm.

4.7 Ocena lekowrażliwości

Oznaczano wrażliwość szczepów na amfoterycynę B (AMB), 5-fluorocytozynę (5FC), flukonazol (FLZ) i itrakonazol (ITZ). Badanie wykonano przy pomocy testu ATB Fungus INT2 firmy bioMérieux. Wynik zapisywano w postaci najniższego stężenia hamującego.

Wykonanie testu przedstawia się następująco:

- 1) Sporządzano zawiesinę komórek drożdży o gęstości 2 w skali McFarlanda.
- 2) 20 μ l zawiesiny dodawano do specjalnego podłoża ATB F2.
- 3) Po homogenizacji dodawano po 135 μ l zaszczepionego podłoża do każdego dołka testu.
- 4) Inkubowano w temperaturze 27°C przez 72 h, jeżeli po tym czasie nie stwierdzano wzrostu, inkubację przedłużano do momentu wzrostu grzybów w dołkach kontrolnych.
- 5) Płytki odczytywano zgodnie z instrukcją i zapisywano wynik w postaci MIC.

4.8 Opracowanie i analiza wyników

Zebrane wyniki zapisano w arkuszu kalkulacyjnym OpenOffice Calc. Dane po wyeksportowaniu do odpowiednich plików opracowywano statystycznie przy użyciu języka i środowiska do obliczeń statystycznych R wersja 2.10.1 [184] w systemie operacyjnym Linux. W powyższych programach zostało wykonanych większość zawartych w pracy wykresów.

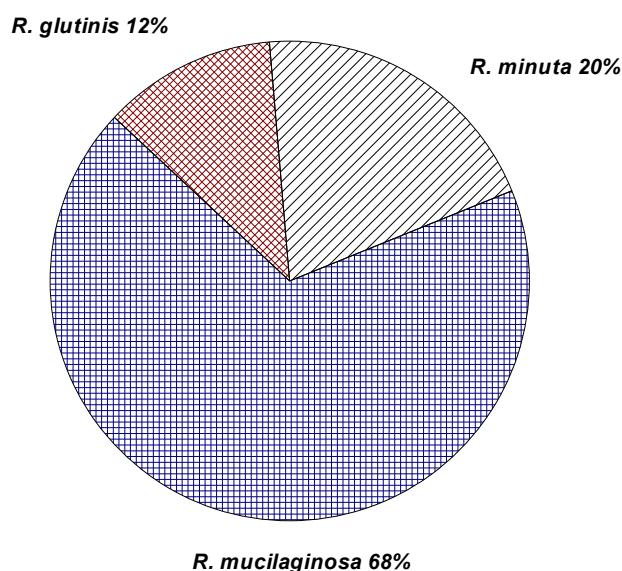
Wszystkie zawarte w pracy ryciny i fotografie zostały wykonane własnoręcznie przez autora. Ryciny wykonano w programie Inkscape w wersji 0.47 poza częścią ryciny 5.22, którą narysowano odręcznie. Fotografie opracowywano przy użyciu programu RawTherapee w wersji 3.0 alpha1 oraz w edytorze obrazów GIMP w wersji 2.7.2. Wszystkie programy działały na platformie Linux z jądrem systemu w wersji 2.6.35.

5 WYNIKI

5.1 Charakterystyka wyizolowanych szczepów

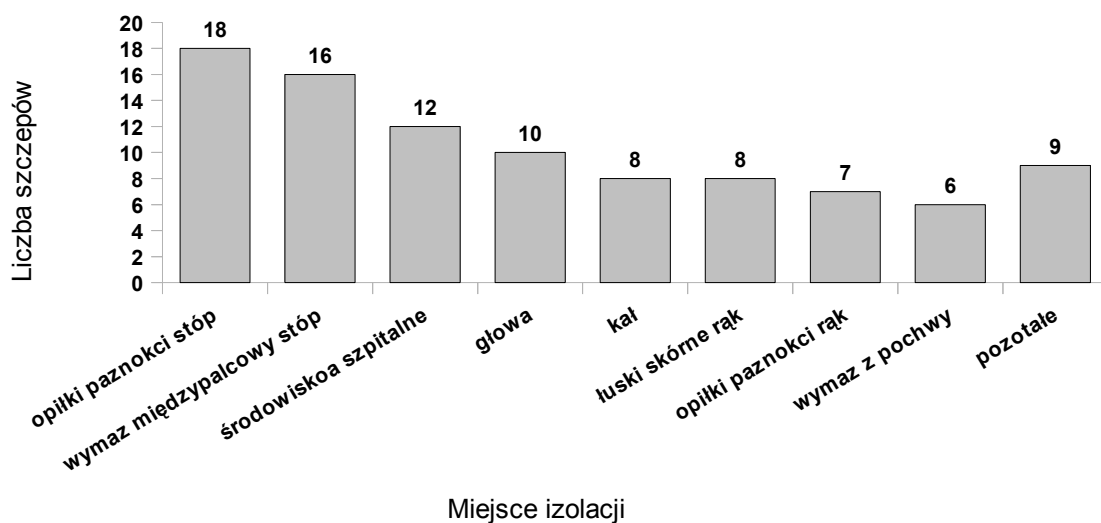
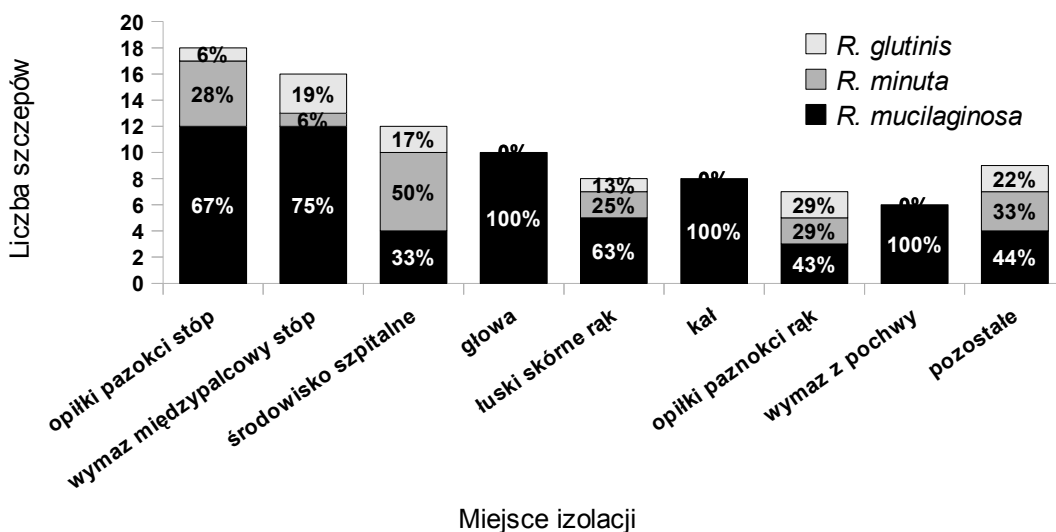
Łącznie wyizolowano 94* szczepy należące do 3 gatunków *Rhodotorula*. Najczęściej występował gatunek *R. mucilaginosa* (64 szczepy), następnie *R. minuta* (19 szczepów) i *R. glutinis* (11 szczepów) – procentowy udział poszczególnych gatunków przedstawiono na rycinie 5.1.

Szczepy najczęściej pochodziły ze stóp (opiłków paznokci i przestrzeni międzypalcowych) łącznie 36,17%, następnie z rąk (opiłki paznokci i łuski skórne) łącznie 15,96%, w następnej kolejności: ze środowiska szpitalnego – 12,77% i z głowy – 10,64% (rycina 5.2). Na rycinie 5.3 przedstawiono, rozkład częstości izolacji poszczególnych gatunków w danym materiale klinicznym.



Rycina 5.1: Procentowy udział gatunków *Rhodotorula* w badanym materiale.

* Liczba ta stanowi liczbę wszystkich szczepów, jakie zostały wyizolowane w przeciągu całego okresu trwania badań. W dalszej części pracy będzie pojawiać się różna (mniejsza) ogólna liczba szczepów, ze względu na ich utratę w trakcie przechowywania.

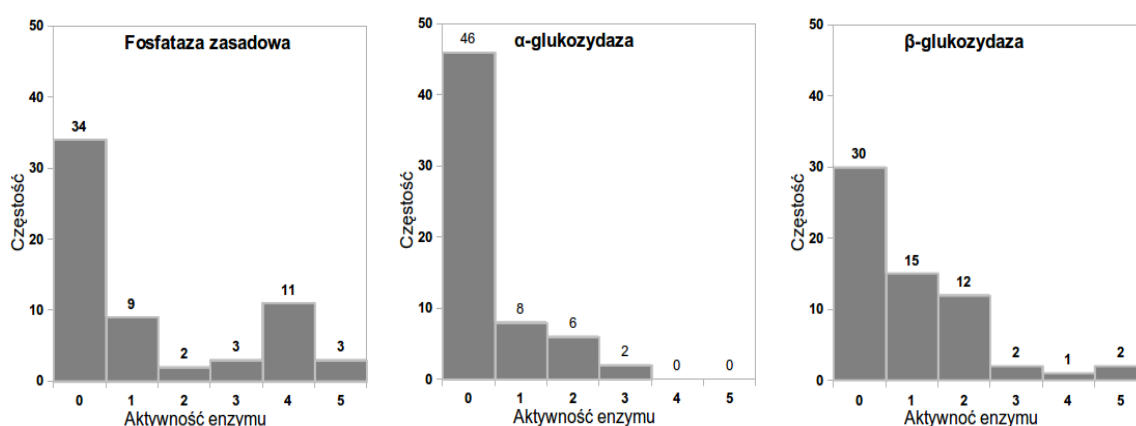
Rycina 5.2: Źródła izolowanych szczepów *Rhodotorula*.Rycina 5.3: Udział gatunków *Rhodotorula* w poszczególnych lokalizacjach.

5.1.1 Biotypowanie

Ze względu na niewielką ilość izolatów należących do *R. glutinis* i *R. minuta* biotypy określono tylko dla *R. mucilaginosa*. Zastosowano dwa podejścia w ustaleniu kryteriów biotypowania na podstawie profili aktywności enzymatycznej testu API ZYM.

Pierwszym podejściem było wybranie odpowiednich enzymów na podstawie analizy występowania aktywności danych enzymów w populacji badanych szczepów (por. rozdz. 4.3.1 *Aktywność enzymów hydrolitycznych*). Cztery enzymy występujące u wszystkich szczepów oraz 7 enzymów, których nie posiadał żaden szczep, nie nadawały się do różnicowania i zostały odrzucone *per se*. Pięć kolejnych enzymów cechujących się niską aktywnością, występujących u niewielkiej ilości szczepów również zostało odrzuconych, gdyż wykorzystanie tych enzymów w biotypowaniu powodowałoby, że rozkład szczepów w poszczególnych biotypach byłby niejednorodny – występowałyby zbyt duża liczba biotypów, do których kwalifikowane byłoby po jednym szczepie.

Pozostałe 3 enzymy wydają się odpowiednie dla biotypowania. Ich występowanie wśród szczepów mieści się w odchyleniu kwartylowym - pomiędzy 25-75%. Są to fosfataza zasadowa – 45,2% szczepów wykazujących aktywność tego enzymu, α -glukozydaza – 25,8% oraz β -glukozydaza 51,6% szczepów (por. rycina 5.4).

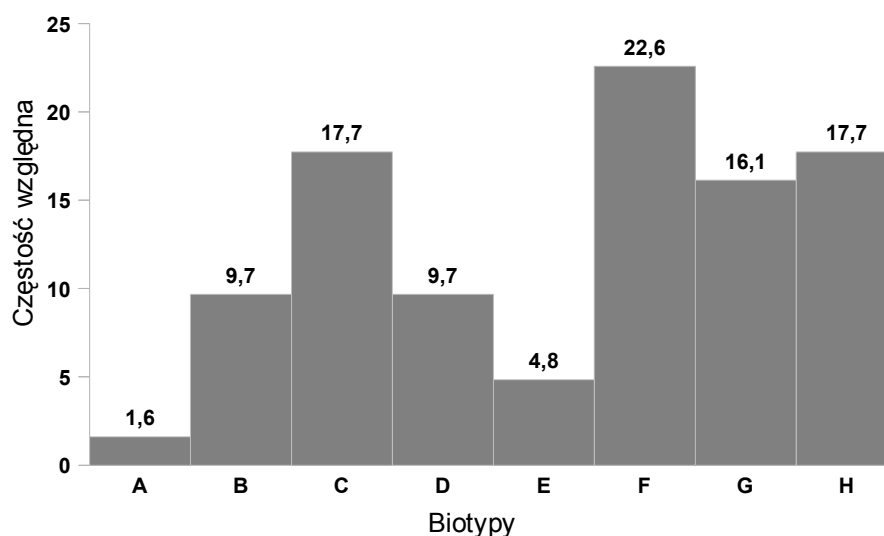


Rycina 5.4: Rozkład aktywności enzymów wybranych do biotypowania.

Przyjęcie tych enzymów za kryteria biotypowania pozwala na zdefiniowanie ośmiu teoretycznych biotypów, umownie określonych kolejnymi literami alfabetu od A do H. Proponowane biotypy przedstawiono w tabeli poniżej. Najliczniej reprezentowany jest biotyp F cechujący się brakiem aktywności fosfatazy zasadowej i α -glukozydazy.

Tabela 5.1: Biotypy *R. mucilaginosa* uzyskana na podstawie występowania aktywności trzech enzymów w teście API ZYM

biotyp	e2	e16	e17	liczba szczepów	%
A	+	+	+	1	1,6
B	+	+	-	6	9,7
C	+	-	+	11	17,7
D	-	+	+	6	9,7
E	-	+	-	3	4,8
F	-	-	+	14	22,6
G	+	-	-	10	16,1
H	-	-	-	11	17,7



Rycina 5.5: Częstość występowania poszczególnych biotypów *R. mucilaginosa*.

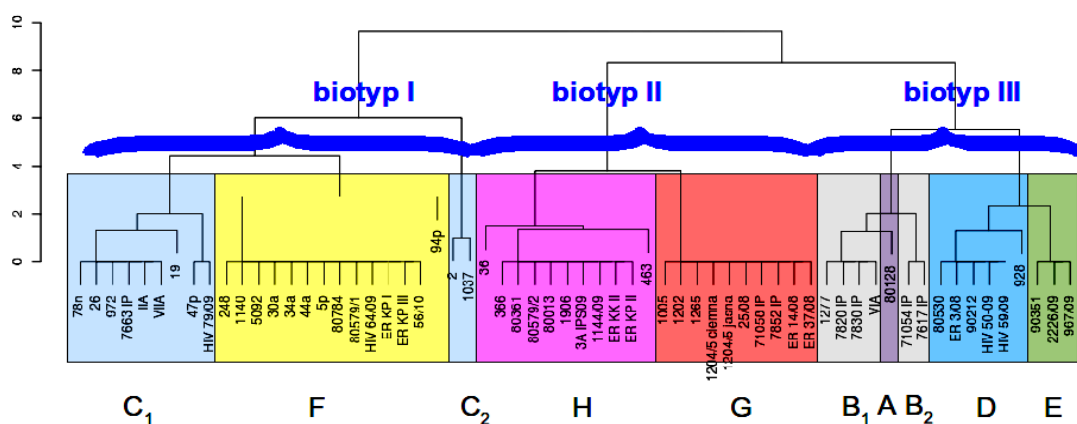
Drugim sposobem określenia biotypów było zastosowanie statystycznej nie nadzorowanej (bez dostępnej *a priori* wiedzy) analizy danych. Dane w tej metodzie dzielone były na grupy (klastry), tak aby każda z grup była możliwie jednorodna (szczepy wewnątrz grupy były podobne do siebie), a jednocześnie klastry były między sobą odmienne (szczepy z różnych grup miały jak najmniej cech wspólnych).

Wyniki podziałów na klastry przedstawiane są w postaci wykresów – dendrogramów. W przypadku najbardziej dopasowanego dendrogramu* okazało się, że szczepy można różnicować na podstawie aktywności glukozydaz. Pozwoliło to na wyodrębnienie 3 biotypów – główne gałęzie na rycinie 5.6 opisane cyframi rzymskimi. Na rycinie zaznaczono również rozkład biotypów uzyskanych metodą arbitralną.

Tabela 5.2: Biotypy uzyskane na podstawie różnic w aktywności glukozydaz w teście API ZYM

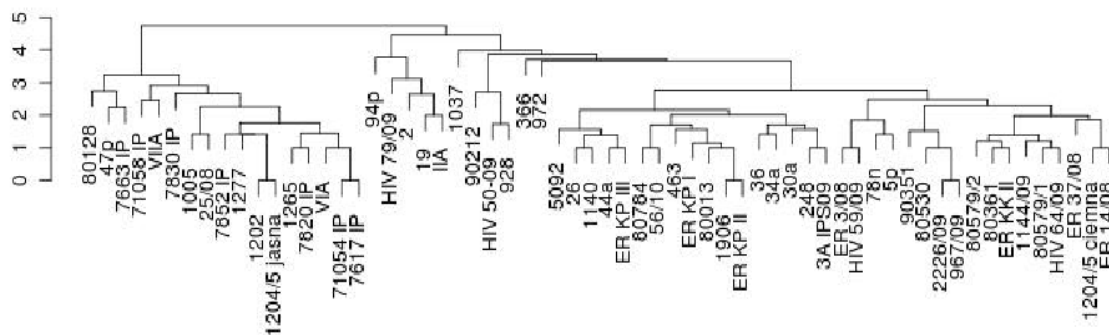
biotyp	e16	e17	biotypy A-H	liczba szczepów (%)
I	-	+	C+F	25 (40,3%)
II	-	-	H+G	21 (33,9%)
III	+	-/+	A+B+D+E	16 (25,8%)
IIIa	+	-	B+E	9 (14,5%)
IIIb	+	+	A+D	7 (11,3%)

* Różne dendrogramy odpowiadają różnym algorytmom podziału badanej populacji na klastry. Najlepszym wynikiem jest podział spełniający oczekiwania badacza – nie ma jednoznacznych kryteriów oceny uzyskanych wyników.



Rycina 5.6: Podobieństwo enzymogramów i biotypy *R. mucilaginosa* przedstawione na dendrogramie.

Zastosowana metoda klasteryzacji pozwala określić podobieństwo szczepów na podstawie analizy występowania wszystkich 19 enzymów testu API ZYM. Do utworzenia dendrogramu zastosowano algorytm klasteryzacji AGNES (hierarchiczna metoda aglomeracyjna) z parametrami `method="ward"` i `metric="manhattan"` [184].



Rycina 5.7: Dendrogram podobieństwa enzymogramów szczepów *R. mucilaginosa* powstały w wyniku klasteryzacji metodą UPGMA.

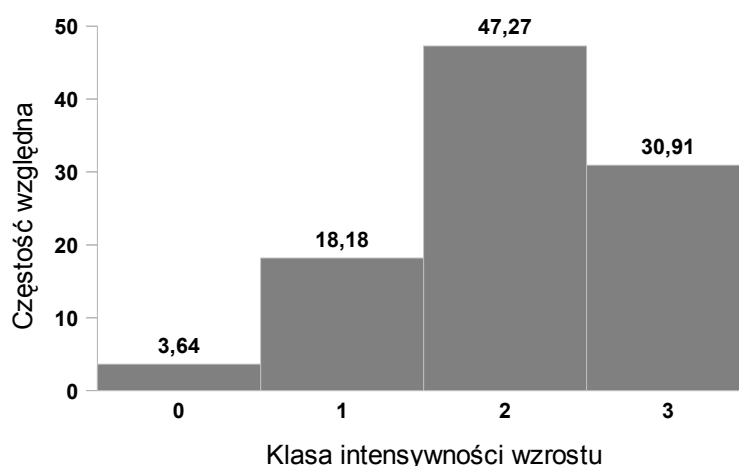
Metoda UPGMA jest rozpowszechniona w biologii molekularnej przy badaniu podobieństw regionów DNA. Ilość uzyskanych tą metodą rozgałęzień (klastrów) nie pozwala na przyjęcie klarownego podziału na biotypy.

5.2 Tolerancja temperatury

W celu określenia termotolerancji szczepów z rodzaju *Rhodotorula* dokonano pomiaru gęstości zawiesiny w podłożu YNB oraz oceny żywotności szczepów *Rhodotorula* na podłożu SGA po uprzedniej pięciodniowej hodowli w podłożu YNB suplementowanym 100 mmol glukozy i w surowicy bydlęcej w temperaturze 37°C. Biorąc pod uwagę uzyskane ze wszystkich tych trzech oznaczeń wyniki, przyjęto 4 stopniową skalę oceny intensywności wzrostu: 0 – brak wzrostu, 1 – wzrost skąpy, 2 – wzrost średnio obfity, 3 – wzrost obfity lub zlewny.

Dwa na trzy przebadane szczepy *R. glutinis* wykazywały dobry wzrost w temperaturze 37°C zarówno po inkubacji w YNB, jak i w surowicy. Z 17 badanych szczepów *R. minuta* cztery (23,53%) wykazały średni wzrost, pozostałe szczepy wzrastały słabo po inkubacji w surowicy. Żaden szczep, poza wyżej wymienionymi czterema, nie wzrastał po inkubacji w podłożu YNB.

Wśród 55 badanych szczepów *R. mucilaginosa* 9 szczepów nie wzrastało po inkubacji w podłożu YNB. Dwa z tych szczepów nie wzrastały w ogóle, a pozostałe wykazywały różny wzrost po inkubacji w surowicy w temperaturze 37°C. Szczepy te zostały zaklasyfikowane na różnych poziomach w przyjętej skali intensywności wzrostu. Dziesięć szczepów wykazywało słaby wzrost, 26 wzrost średnio obfity, a 17 obfity/zlewny – por. rycina 5.8.

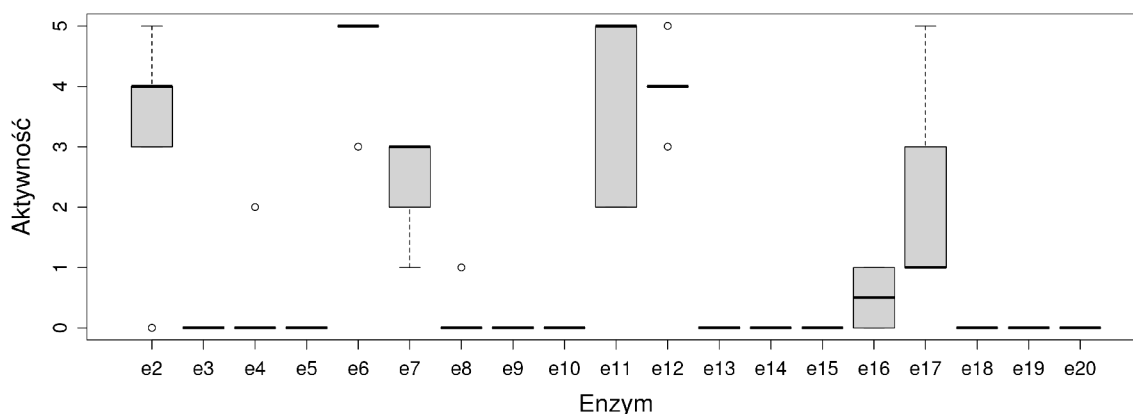


Rycina 5.8: Rozkład intensywności wzrostu szczepów *R. mucilaginosa* w temperaturze 37°C.

5.3 Aktywność enzymatyczna

5.3.1 Aktywność enzymów w teście API ZYM

Wśród przebadanych szczepów ($n = 6$) należących do gatunku *R. glutinis* nie stwierdzono w teście API ZYM aktywności 10 enzymów (esterazy, lipazy C14, trypsyny, chymotrypsyny, α - i β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, N-acetylo-glukozyloamidazy, α -mannozydazy i α -fukozydazy). W przypadku lipazy-esterazy (C8) i arylamidazy cystyny szczepy odpowiednio 509/1, 855 wykazywały ich niską aktywność. Bardzo niską aktywność α -glukozydazy wykazała połowa z badanych szczepów. Aktywność arylamidazy leucyny, arylamidazy waliny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftolu oraz β -glukozydazy wykazały wszystkie badane szczepy, a aktywności fosfatazy zasadowej nie wykazał tylko jeden szczep (43/09) – rycina 5.9.

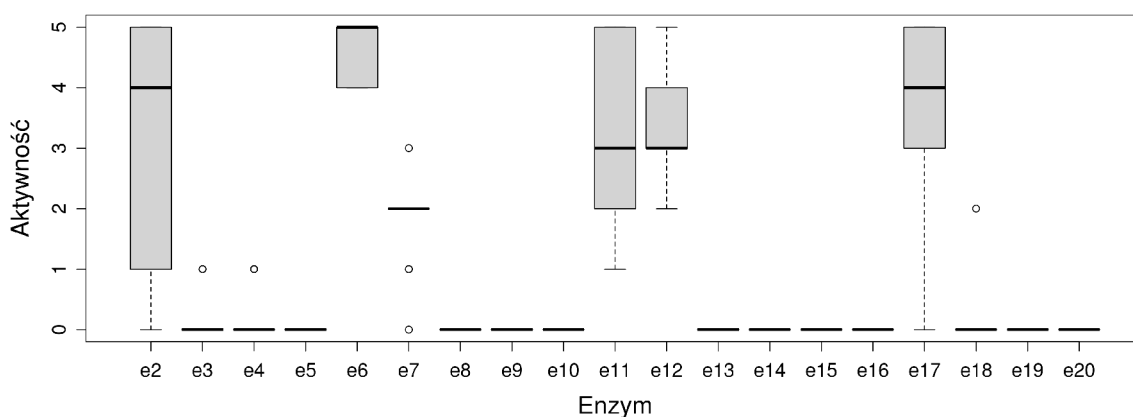


Rycina 5.9: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku *R. glutinis*.

Oznaczenie enzymów jak w tabeli 4.1 na stronie 33. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartylnowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

Szczepy *R. minuta* ($n = 17$) wykazywały brak aktywności dziewięciu enzymów w teście API ZYM (arylamidazy cystyny, trypsyny, chymotrypsyny, α - i β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, α -glukozydazy, α -mannozydazy i α -fukozydazy). Niską aktywność

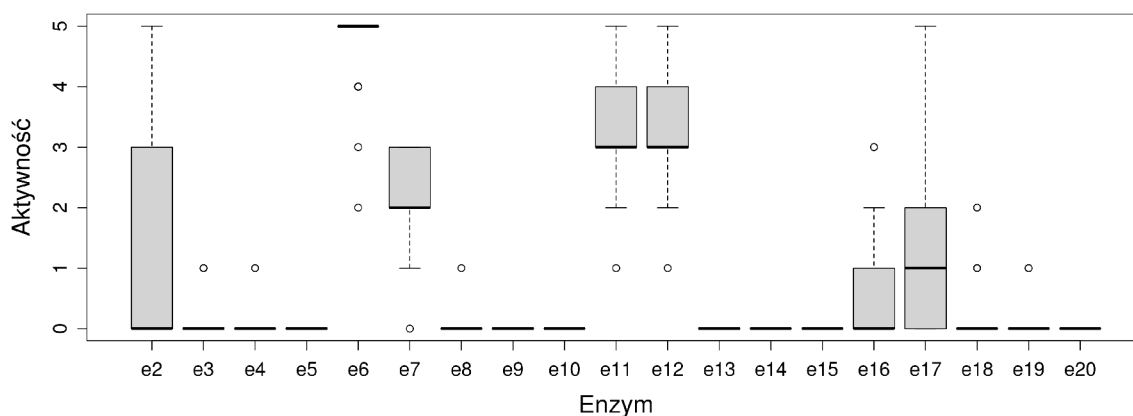
N-acetylo- β -glukozyloamidazy wykazał jeden szczep (1222). Wszystkie szczepy wykazywały aktywność arylamidazy leucyny, arylamidazy waliny (z wyjątkiem szczepu 193), fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftolu, β -glukozydazy (z wyjątkiem szczepu III). 76,47% (n=13) szczepów wykazywało aktywność fosfatazy zasadowej, 11,76% (n = 2) bardzo niską aktywność esterazy (C4), natomiast 23,53% bardzo niską aktywność lipazy-esterazy (C8) – rycina 5.10.



Rycina 5.10: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku *R. minuta*.

Oznaczenie enzymów jak w tabeli 4.1 na stronie 33. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartylowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

R. mucilaginosa (n = 62), jak wspomniano w rozdziale dotyczącym biotypowania, cechuje się brakiem aktywności siedmiu enzymów: lipazy (C14), trypsyny, chymotrypsyny, α - i β -galaktozydaz, α -fukozydazy. Bardzo niską aktywność przedstawionych poniżej enzymów, nieprzekraczającą 1 w przyjętej skali oceny, wykazywały nieliczne szczepy. Dla esterazy (C4) były to 3 szczepy, dla lipazy-esterazy (C8) – 2 szczepy, aktywność arylamidazy cystyny wykazywał 1 szczep, α -mannozydazy – 2 szczepy. Aktywność N-acetylo- β -glukozyloamidazy wykazało 6 (9,68%) szczepów. 51,61% (n = 32) szczepów wykazało aktywność β -glukozydazy, 45,16% (n = 28) aktywność fosfatazy zasadowej i 25,81% (n = 16) α -glukozydazy, natomiast wszystkie szczepy posiadały aktywność arylamidazy leucyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftolu oraz tylko jeden z przebadanych szczepów (928) nie posiadał aktywności arylamidazy waliny. Rycina 5.11.



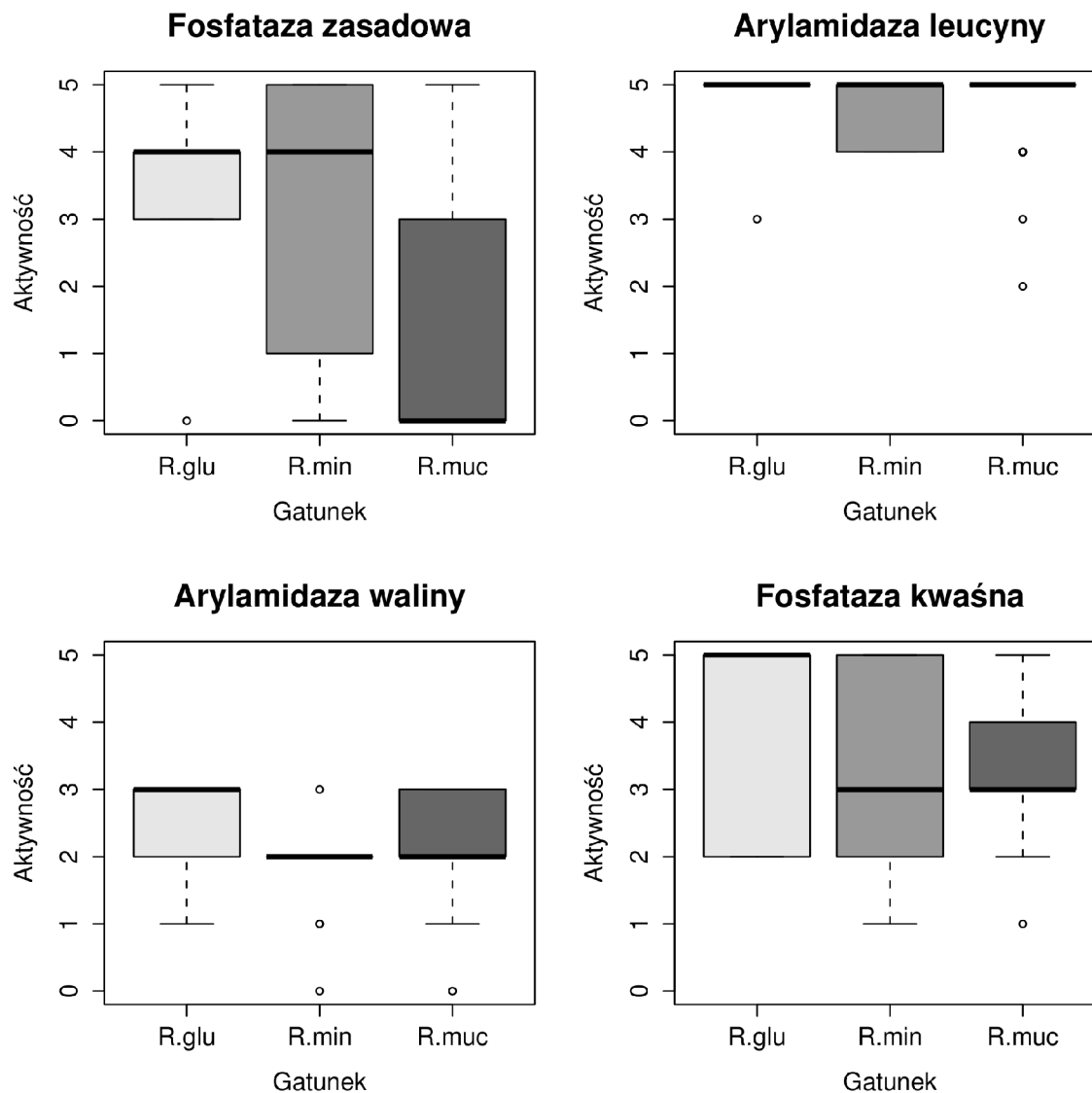
Rycina 5.11: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku *R. mucilaginosa*.

Oznaczenie enzymów jak w tabeli 4.1 na stronie 33. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

Na rycinach 5.12 i 5.13 przedstawiono szczegółowe porównanie najbardziej aktywnych dla rodzaju *Rhodotorula* enzymów w teście API ZYM. *R. mucilaginosa* wykazuje znacznie niższą aktywność fosfatazy zasadowej niż *R. minuta* (test Manna-Whitneya, $p = 0,0058$) i *R. glutinis* (test Manna-Whitneya, $p = 0,0217$). Natomiast nie stwierdzono różnicy w aktywności tego enzymu między szczepami *R. minuta* i *R. glutinis* (test Manna-Whitneya, $p = 0,8288$). Należy pamiętać, że ze względu na małą liczebność szczepów *R. glutinis* wyniki porównań dla tego gatunku mogą być obarczone błędem.

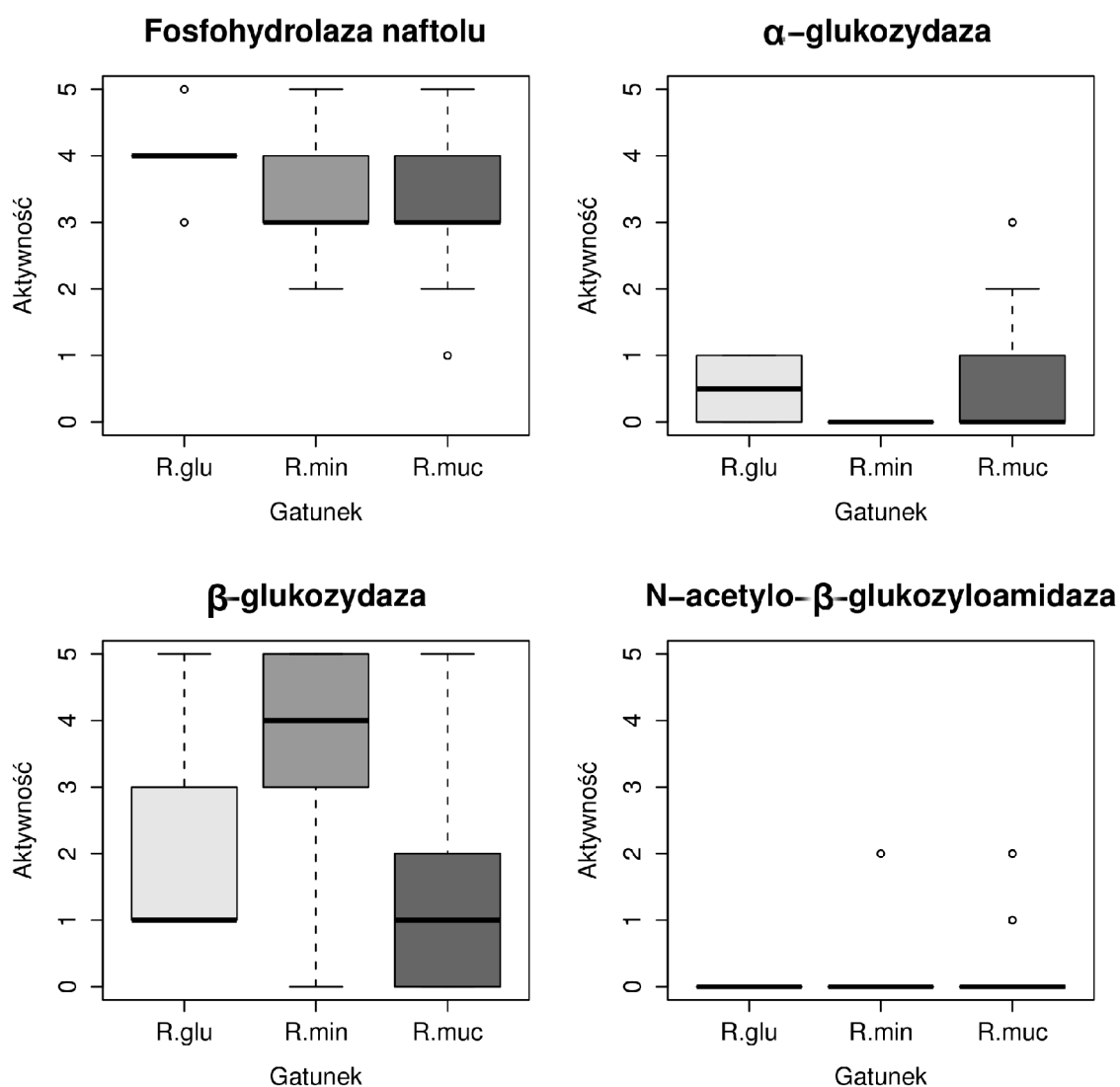
Arylamidaza leucyny cechowała się najwyższą aktywnością bez wyraźnych różnic międzygatunkowych (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,8633$). Nie stwierdzono również różnic w aktywności arylamidazy waliny (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,1503$), fosfatazy kwaśnej (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,4567$), fosfohydrolazy naftolu (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,0904$) między szczepami różnych gatunków *Rhodotorula*. Nie stwierdzono różnic w aktywności α -glukozydazy między szczepami *R. mucilaginosa* i *R. glutinis* (test Manna-Whitneya, $p = 0,3725$). Natomiast szczepy *R. minuta* nie wykazały żadnej aktywności tego enzymu.

R. minuta wykazuje znacznie wyższą aktywność β -glukozydazy niż *R. mucilaginosa* (test Manna-Whitneya, $p = 0,00885$). Nie ma natomiast różnicy między aktywnością *R. mucilaginosa* i *R. glutinis* (test Manna-Whitneya, $p = 0,0582$) oraz między *R. minuta* i *R. glutinis* (test Manna-Whitneya, $p = 0,0821$).



Rycina 5.12: Porównanie aktywności wybranych enzymów w teście API ZYM dla grzybów z rodzaju *Rhodotorula*.

R.muc - *R. mucilaginosa*, **R.min** - *R. minuta*, **R.glu** - *R. glutinis*. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.



Rycina 5.13: Porównanie aktywności wybranych enzymów w teście API ZYM dla grzybów z rodzaju *Rhodotorula* – c.d.

R.muc - *R. mucilaginosa*, **R.min** - *R. minuta*, **R.glu** - *R. glutinis*. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

5.3.2 Aktywność fosfolipazy

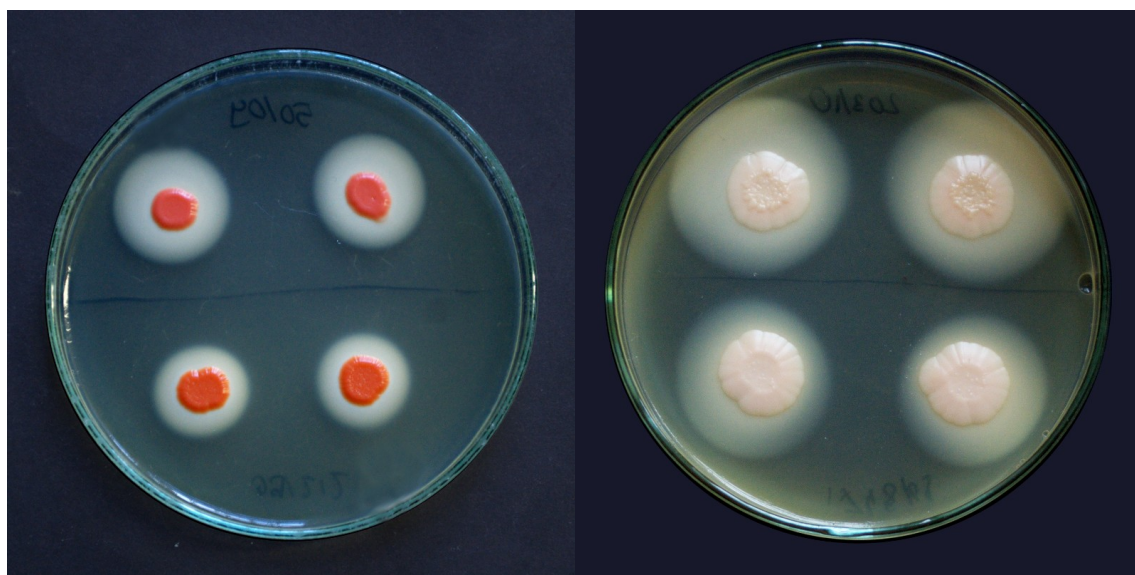
Aktywność fosfolipazy w temperaturze 27°C została oznaczona dla 5 szczepów *R. glutinis*. 3 szczepy nie wykazały żadnej aktywności ($P_z = 1$), żaden z tych szczepów nie wzrastał w 37°C. Pozostałe 2 szczepy wykazały dosyć wysoką aktywność fosfolipazy w 27°C, która dodatkowo zwiększyła się w oznaczeniu w temperaturze 37°C.

Szczepy należące do gatunku *R. minuta* nie wzrastały na podłożu EYA dlatego też niemożliwa była ocena aktywności fosfolipazy dla tego gatunku. Tylko jeden szczep (359) wykazał $P_z = 0,5$ w 27°C, ale w 37°C szczep ten nie wzrastał.

Szczepy *R. mucilaginosa* dobrze wzrastały na podłożu EYA zarówno w temperaturze 27°C, jak i 37°C. Spośród 58 szczepów poddanych badaniu w temperaturze 27°C nie wzrastały trzy (5,17%), przy czym jeden z tych szczepów wzrastał dobrze w 37°C. Jeden szczep (ERKPIII) nie wykazywał w tej temperaturze aktywności fosfolipazy. Mediana (średnia) aktywności fosfolipazy wyrażona wartością współczynnika P_z wynosiła 0,46 (0,47).

Ocenie aktywności w temperaturze 37°C poddanych zostało 55 szczepów *R. mucilaginosa*. W tej temperaturze nie wzrastało 10 szczepów (18,18%), 4 szczepy nie wykazywały aktywności fosfolipazy. Mediana (średnia) wartość P_z dla tej temperatury wynosiła 0,35 (0,43).

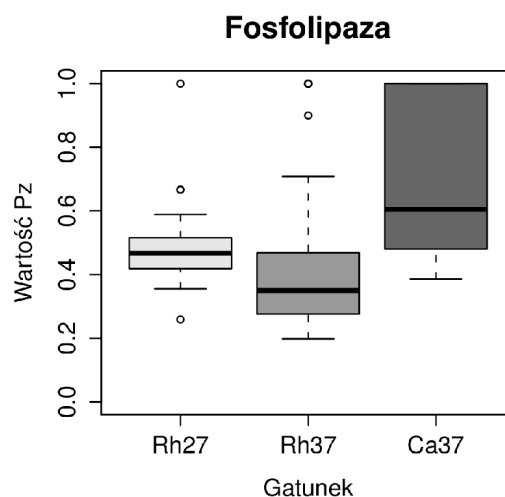
79 szczepów *C. albicans* zostało użytych jako kontrola. Dwadzieścia dwa szczepy (27,85%) nie wykazywały aktywności fosfolipolitycznej. Mediana wartości P_z wynosiła 0,64 (średnia wartość $P_z = 0,68$).



Rycina 5.14: Oznaczenie aktywności fosfolipazy na podłożu EYA.

Białe halo wokół kolonii świadczy o aktywności enzymu. Po lewej – *R. mucilaginosa*, po prawej – *C. albicans*.

Stwierdzono wyższą aktywność fosfolipazy dla szczepów *R. mucilaginosa* w 37°C niż w 27°C (test Wilcozona, $p = 0,0294$). Szczepy *R. mucilaginosa* wykazały również większą aktywność fosfolipazy (test Manna-Whitneya, $p = 0,0004$) niż szczepy *C. albicans* – rycina 5.15.



Rycina 5.15: Aktywność fosfolipazy wyrażona wartością Pz.

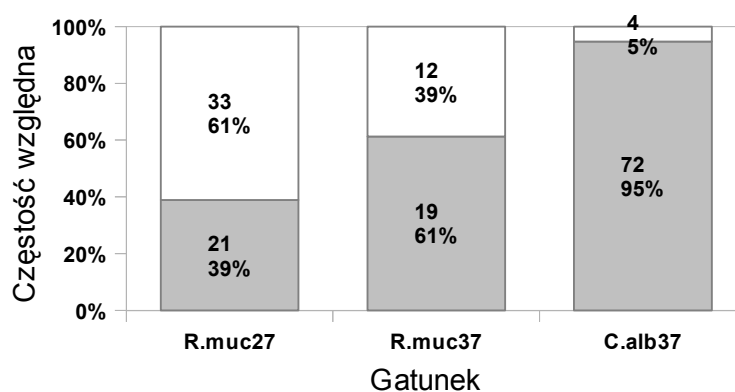
Rh27 – *R. mucilaginosa* w 27°C, **Rh37** – *R. mucilaginosa* w 37°C i **Ca37** – *C. albicans* w 37°C. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

5.3.3 Aktywność proteazy aspartylowej

Z przebadanych szczepów *R. glutinis* (n=3) żaden nie wykazał aktywności proteiny w temperaturze 27°C, w temperaturze 37°C wzrastał tylko jeden z tych szczepów i również nie wykazywał aktywności proteolitycznej.

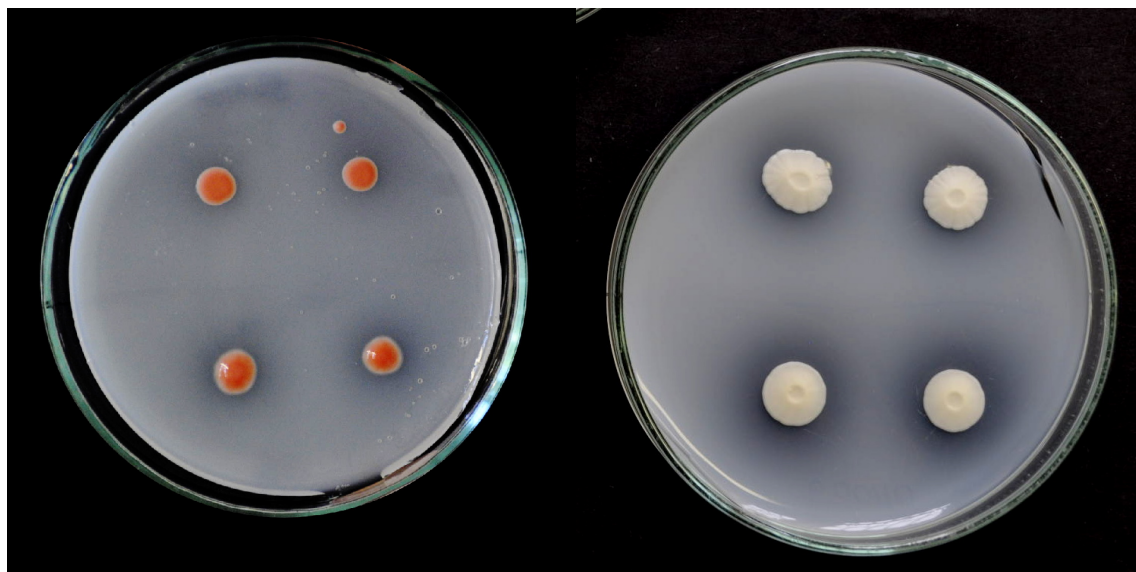
Z 17 szczepów *R. minuta* tylko jeden (1911) wykazywał aktywność proteolityczną w temperaturze 27°C. W temperaturze 37°C wzrastało tylko 5 szczepów, z czego dwa (1191, HIV55/09) wykazywały aktywność proteazy.

Wśród szczepów *R. mucilaginosa* proteazę w temperaturze 27°C wytwarzało 21 (38,89%) z 54 przebadanych szczepów, średnia aktywność tego enzymu wyrażona współczynnikiem P_z wynosiła 0,89. W temperaturze 37°C wzrastało 31 szczepów (57,41%), z czego 19 wykazywało aktywność proteiny – średnia wartość P_z wynosiła 0,75. Różnice w występowaniu aktywności proteolitycznej wśród szczepów wzrastających w 27 i 37°C są istotne (test χ^2 , $p = 0,0464$) – rycina 5.16. Również w 37°C szczepy *R. mucilaginosa* wykazują wyższą aktywność proteolityczną niż w 27°C (test Wilcoxon, $p = 0,0011$).



Rycina 5.16: Częstość występowania aktywnych proteolitycznie (kolor szary) szczepów *R. mucilaginosa* i *C. albicans*.

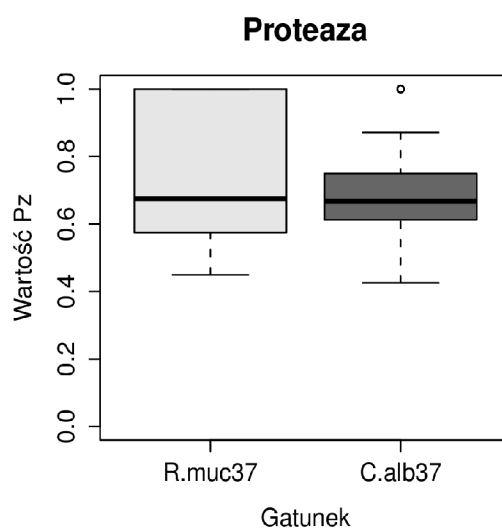
R.muc27 i **R.muc37** – szczepy *R. mucilaginosa* inkubowane odpowiednio w temperaturze 27 i 37°C; **C.alb37** – szczepy *C. albicans* inkubowane w temperaturze 37°C. Liczby wewnątrz słupków odpowiadają ilości szczepów.



Rycina 5.17: Oznaczenie aktywności proteiny aspartylowej na podłożu BSAA.

Przejaśnienia wokół kolonii świadczą o rozkładzie białka przez badany enzym. Po lewej – *R. mucilaginosa*; po prawej *C. albicans*.

W porównaniu ze wzrastającymi w 37°C szczepami *R. mucilaginosa* (61,29%) prawie wszystkie szczepy *C. albicans* (97,30%, n=76) wykazały aktywność proteiny w tej temperaturze. Średnia wartość współczynnika P_z równa się 0,69. Nie ma jednak różnic w poziomie aktywności proteolitycznej między tymi gatunkami (test Manna-Whitneya, $p = 0,5657$) – rycina 5.18.



Rycina 5.18: Porównanie aktywności proteolitycznej szczepów *R. mucilaginosa* (R.muc37) i *C. albicans* (C.alb37) na podłożu z albuminą bydlęcą w 37°C.

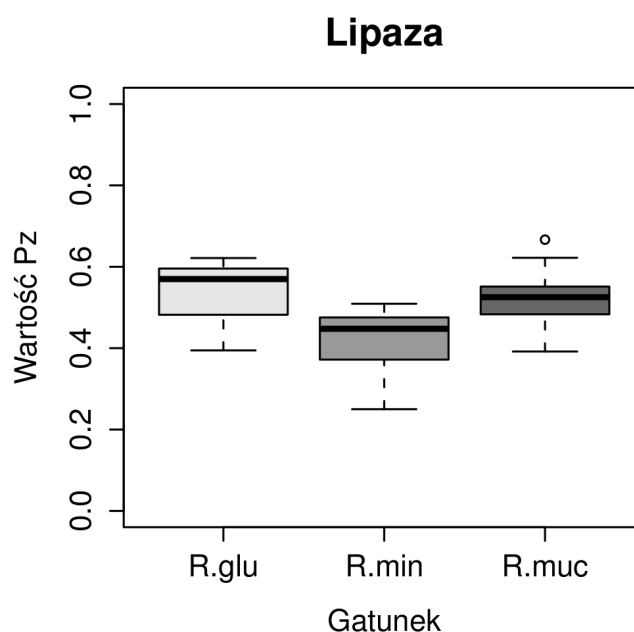
Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartylowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

5.3.4 Aktywność lipazy

Szczepy *R. glutinis* ($n = 3$) wykazywały średnią wartość współczynnika P_Z aktywności lipolitycznej w temp 27°C wynoszącą 0,52, natomiast w przypadku *R. minuta* ($n=14$) średnia wartość P_Z wynosiła 0,42. W temperaturze 37°C szczepy tych gatunków nie wzrastały (poza słabym wzrostem bez aktywności lipolitycznej szczepu 1222 należącego do *R. minuta*)

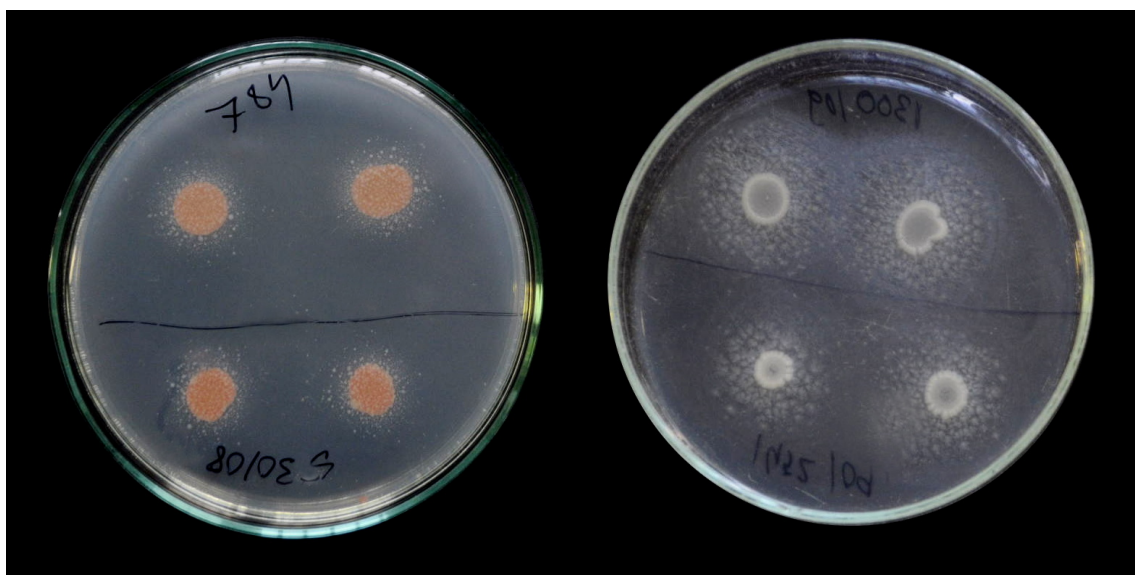
W temperaturze 27°C wszystkie szczepy *R. mucilaginosa* wykazywały aktywność lipolityczną ($n = 48$), a średni współczynnik P_Z wynosił 0,52. Z 48 badanych szczepów w temperaturze 37°C wzrastało 16 (33,33%), z czego tylko połowa (16,67%) wykazała aktywność lipolityczną ze średnim współczynnikiem $P_Z = 0,36$ (z uwzględnieniem szczepów niewykazujących aktywności lipazy ($P_Z = 1$) średnia wartość współczynnika wynosiła 0,64).

Wszystkie szczepy *C. albicans* ($n=70$) wykazywały aktywność lipazy. Średnia wartość współczynnika P_Z wynosiła 0,29 (mediana 0,22).



Rycina 5.19: Porównanie aktywności lipolitycznej w 27°C szczepów z rodzaju *Rhodotorula*.

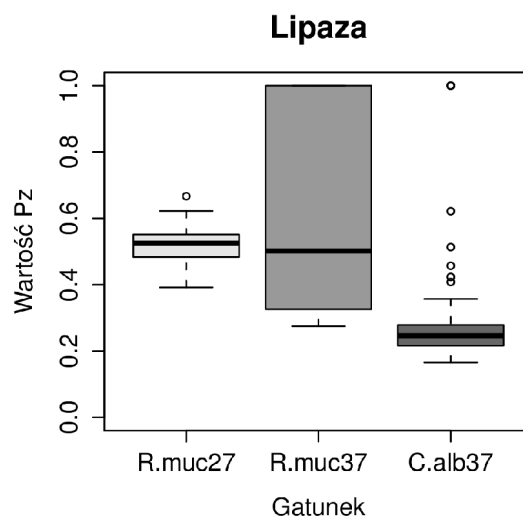
R.glu – *R. glutinis*, **R.min** – *R. minuta*, **R.muc** – *R. mucilaginosa*. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.



Rycina 5.20: Oznaczenie aktywności lipazy na podłożu z mieszaniną Tweenów.

Strefa precypitacji widoczna w postaci halo wokół kolonii. Po lewej – *R. mucilaginosa*, po prawej – *C. albicans*.

Nie ma wyraźnych różnic międzygatunkowych w aktywności lipolitycznej szczepów *Rhodotorula* w temperaturze 27°C (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,0616$). Natomiast szczepy należące do *C. albicans* cechowały się znacznie wyższą aktywnością lipazy (temp. 37°C) niż szczepy *Rhodotorula* w temp. 27°C (test Manna-Whitneya, $p < 0,0001$) i w temperaturze 37°C (test Manna-Whitneya, $p = 0,0036$).



Rycina 5.21: Porównanie aktywności lipolitycznej szczepów *R. mucilaginosa* i *C. albicans*.

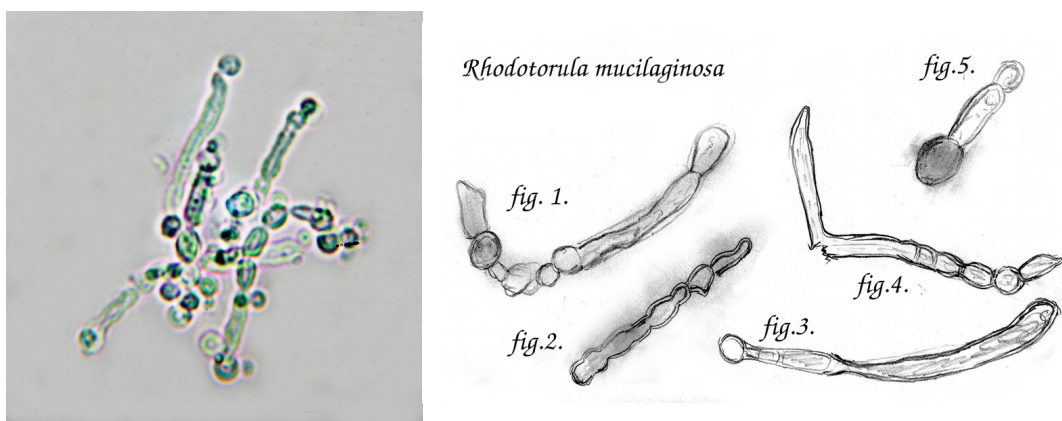
R.muc27 i **R.muc37** – szczepy *R. mucilaginosa* inkubowane odpowiednio w temperaturze 27 i 37°C; **C.alb37** – szczepy *C. albicans* inkubowane w temperaturze 37°C. Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

5.4 Dimorfizm drożdżowo-mycelialny

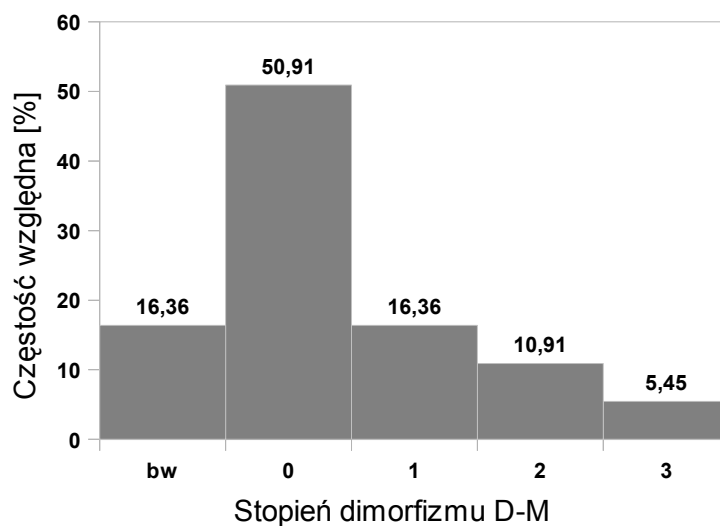
Z przebadanych 3 szczepów *R. glutinis* jeden wykazywał wzrost niepozwalający na ocenę zdolności tworzenia pseudostrzępek. Pozostałe dwa nie wykazywały tej zdolności. Dwanaście szczepów *R. minuta* również nie tworzyło pseudostrzępek w warunkach testowych. Dla 5 szczepów tego gatunku nie udało się oznaczyć tej własności.

W przypadku *R. mucilaginosa* stwierdzono, że 18 (32,73%) z badanych szczepów wykazuje zdolność przejścia z fazy drożdżowej do pseudostrzępkowej. Dwadzieścia osiem szczepów (50,91%) nie posiada tej zdolności, a dla 9 (16,36%) nie udało się określić tego parametru.

Uwzględniając stosunek ilości komórek tworzących strzępki do komórek w formie drożdżowej oraz intensywność wzrostu w podłożu określono 4 klasy tworzenia strzępek: 0 – szczep wzrasta w postaci drożdżowej; 1 – szczep wzrasta w postaci drożdżowej, tylko nieliczne pseudostrzępki są obecne w preparacie; 2 – faza drożdżowa i faza mycelialna występuje w zbliżonych ilościach; 3 – szczep wzrasta głównie w postaci strzępkowej. Częstość występowania poszczególnych klas przedstawiono na rycinie 5.23.



Rycina 5.22: Pseudostrzępki wytworzone przez *R. mucilaginosa* po pięciodniowej inkubacji w surowicy w temperaturze 37°C.



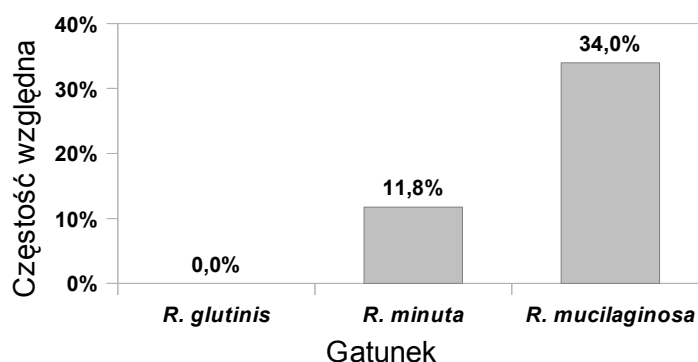
Rycina 5.23: Częstość występowania przejścia z fazy drożdżowej do strzępkowej (D-M) szczepów *R. mucilaginosa*.

0-3 – poszczególne stopnie przejścia z fazy drożdżowej do pseudostrzępkowej, bw – brak wzrostu pozwalającego na ocenę.

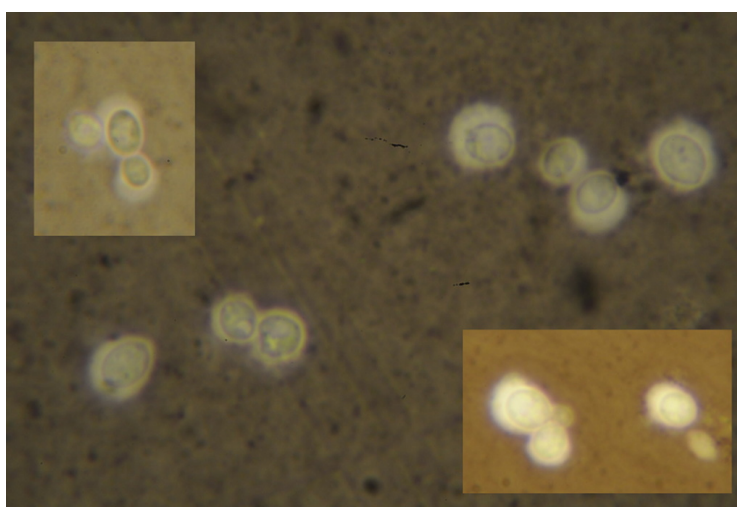
5.5 Tworzenie otoczek

Występowanie otoczek stwierdzono u 20 (27,4%) z 73 przebadanych pod tym kątem szczepów *Rhodotorula* sp. Żaden szczep *R. glutinis* ($n = 3$), dwa szczepy *R. minuta* ($n = 17$) oraz 18 szczepów *R. mucilaginosa* ($n = 53$) wytwarzało otoczki. Procentowy udział szczepów tworzących otoczki dla poszczególnych gatunków przedstawiono na rycinie 5.24.

Nie stwierdzono różnic (test Fischera, $p = 0,2230$) w częstości występowania szczepów tworzących otoczki wśród *R. minuta* i *R. mucilaginosa*. Jako kontroli użyto trzy szczepy *Cryptococcus neoformans* – wszystkie wytworzyły otoczki.



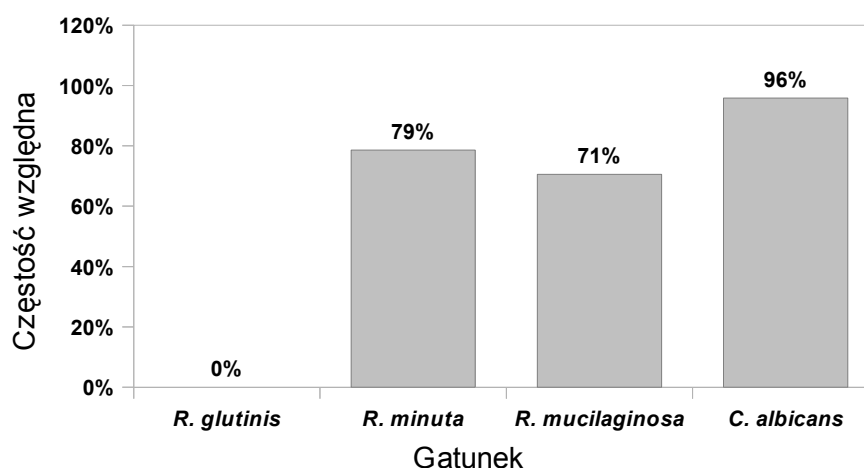
Rycina 5.24: Częstość występowania otoczek wśród szczepów poszczególnych gatunków *Rhodotorula*.



Rycina 5.25: Otoczki *Rhodotorula* sp. Barwienie tuszem chińskim.

5.6 Zdolność tworzenia biofilmu

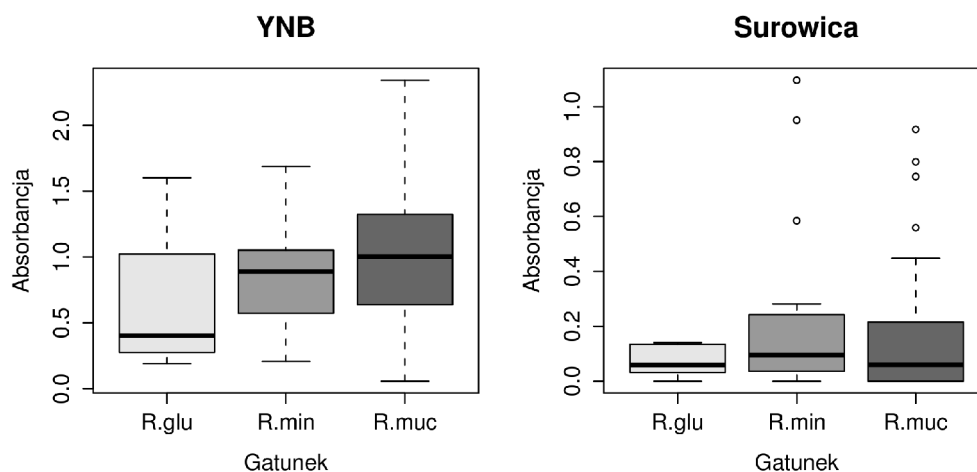
Wszystkie szczepy *Rhodotorula* niezależnie od gatunku wytworzyły biofilm w YNB. Z czterech szczepów *R. glutinis* jeden nie tworzył biofilmu w surowicy. Z 14 szczepów *R. minuta* w surowicy biofilmu nie tworzyły 3 (21,43%). Z 51 badanych szczepów *R. mucilaginosa* 15 (29,41%) nie wykazywało aktywności biofilmotwórczej w surowicy. Dwadzieścia pięć szczepów *C. albicans*, z 72 badanych, nie tworzyło biofilmu w YNB, natomiast w surowicy 3. Jeden (1050/10) nie tworzył biofilmu zarówno w YNB, jak i w surowicy – por. rycina 5.26.



Rycina 5.26: Porównanie badanych gatunków pod względem ilości szczepów tworzących biofilm w surowicy.

Nie stwierdzono różnic międzygatunkowych w zdolności tworzenia biofilmu dla rodzaju *Rhodotorula* zarówno w podłożu YNB (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,2588$) jak i w surowicy bydlęcej (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,6860$). Stwierdzono natomiast niższą zdolność tworzenia biofilmu w surowicy niż w YNB dla *R. minuta* (test Wilcoxona*, $p = 0,0052$) oraz dla *R. mucilaginosa* (test Wilcoxona $p = 0,0001$). Dla *R. glutinis*, chociaż wartości absorbancji dla surowicy są niższe niż dla YNB, zbyt mała ilość szczepów nie pozwoliła na przeprowadzenie analizy statystycznej. Porównanie rozkładów absorbancji odpowiadających intensywności tworzenia biofilmu przedstawiono na rycinie 5.27.

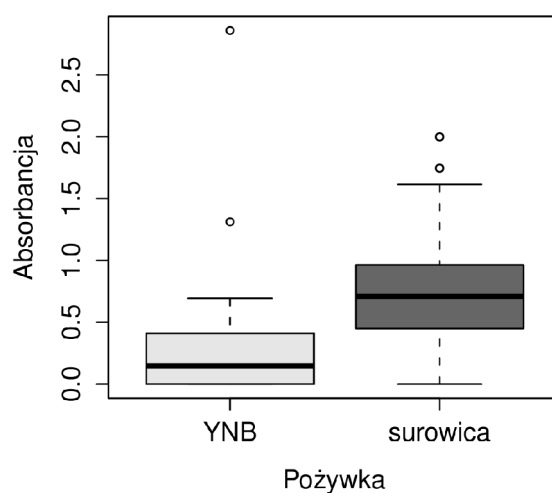
* W tym teście uwzględniono tylko te szczepy, dla których uzyskano wyniki zarówno w przypadku inkubacji w YNB, jak i w surowicy.



Rycina 5.27: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez gatunki *Rhodotorula* w podłożu YNB i surowicy bydłej.

Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające. Dla lepszej czytelności na wykresach zastosowano różne skale - nie można zatem porównywać ich bezpośrednio.

W przypadku *C. albicans* obserwowano odwrotną sytuację. W surowicy zdolność tworzenia biofilmu wyrażona absorbancją była wyższa niż w YNB (test Wilcoxona, $p = 0,0005$) – rycina 5.28.



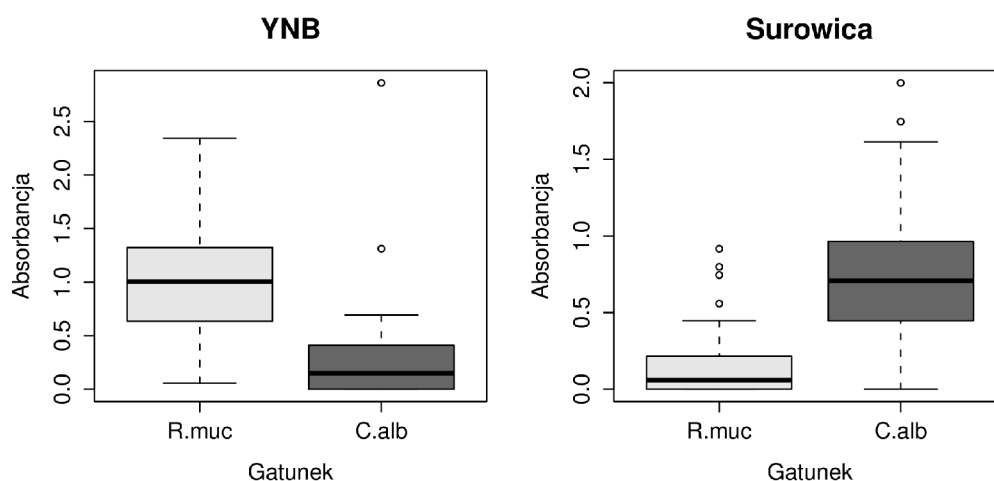
Rycina 5.28: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu w zależności od zastosowanej pożywki dla *C. albicans*.

Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

C. albicans wykazywała większe tempo tworzenia biofilmu niż *R. mucilaginosa* w surowicy (test Manna-Whitneya, $p < 0,00001$), natomiast niższe w YNB (test Manna-Whitneya, $p < 0,00001$). Tempo tworzenia biofilmu *C. albicans* w YNB było takie samo jak *R. mucilaginosa* w surowicy (test Manna-Whitneya, $p = 0,3344$), natomiast intensywność tworzenia biofilmu w surowicy przez *C. albicans* była niższa od intensywności tworzenia biofilmu przez *R. mucilaginosa* w YNB (test Manna-Whitneya, $p = 0,0029$). Wartości średnie i odchylenia standardowe intensywności tworzenia biofilmu dla poszczególnych gatunków w określonych pożywkach przedstawiono w tabeli 5.3.

Tabela 5.3: Porównanie średnich absorbancji tworzenia biofilmu przez badane gatunki grzybów

gatunek	n	YNB		n	surowica	
		średnia (mediana)	SD		średnia (mediana)	SD
<i>R. glutinis</i>	4	0,65 (0,40)	0,64	5	0,07 (0,06)	0,06
<i>R. minuta</i>	15	0,85 (0,89)	0,40	15	0,24 (0,09)	0,35
<i>R. mucilaginosa</i>	52	1,03 (1,00)	0,58	51	0,16 (0,06)	0,22
<i>C. albicans</i>	72	0,25 (0,15)	0,40	72	0,74 (0,71)	0,42



Rycina 5.29: Porównanie intensywności tworzenia biofilmu w YNB i surowicy przez szczepy *R. mucilaginosa* (R.muc) i *C. albicans* (C. alb).

Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające. Dla lepszej czytelności na wykresach zastosowano różne skale - nie można zatem porównywać ich bezpośrednio.

5.7 Lekowrażliwość

Lekowrażliwość dla AMB, 5FC, FLZ, ITZ oznaczoną testem ATB Fungus INT 2 udało się uzyskać dla 85 szczepów *Rhodotorula* sp. Wszystkie szczepy, niezależnie od gatunku, wykazywały niskie wartości MIC dla 5FC i AMB. W przypadku leków azolowych, *R. mucilaginosa* wykazała w większości przypadków wysokie wartości MIC na oba badane leki ITR i FLZ. W przypadku *R. minuta* wartości MIC dla FLZ były wysokie – średnia geometryczna = 21,8 mg/l, a dla ITZ niskie – średnia geometryczna = 0,15 mg/l. U szczepów *R. glutinis* obserwowano dużą zmienność w wartościach MIC dla obu leków. Jeden szczep *R. glutinis* (43/09) wykazał podwyższoną wartość MIC dla 5FC (2 mg/l) jednocześnie miał najniższą dla tego gatunku wartość MIC dla FLZ (16 mg/l). Dwa szczepy *R. mucilaginosa* wykazywały niskie wartości MIC dla FLZ i ITZ wynoszące odpowiedni 2 i 0,125 mg/l. Jeden szczep wykazał niską = 8 mg/l wartość MIC dla FLZ, przy wartości MIC dla ITZ = 2 mg/l. Szczegółowe dane na temat lekowrażliwości szczepów *Rhodotorula* sp. przedstawiono w tabelach 5.4 i 5.5.

Tabela 5.4: Wrażliwość szczepów *Rhodotorula* sp. na leki przeciwgrzybicze

gatunek	liczba	lek	zakres MIC	śr. geom.	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>R. glutinis</i>	6	5FC	0,5-2	0,63	0,5	0,5
		AMB	0,5	0,5	0,5	2
		FLZ	16-64	40,32	32	64
		ITZ	0,125-4	1,26	2	4
<i>R. minuta</i>	18	5FC	0,5	0,5	0,5	0,5
		AMB	0,5-1	0,54	0,5	1
		FLZ	8-64	21,77	16	64
		ITZ	0,125-0,25	0,15	0,125	0,25
<i>R. mucilaginosa</i>	61	5FC	0,5	0,5	0,5	0,5
		AMB	0,5-1	0,52	0,5	0,5
		FLZ	2->128	87,97*	128	128
		ITZ	0,125->4	4,23*	4	>4

*w celu obliczenia średniej geometrycznej dla wartości niemieszczących się w granicach oznaczalności testu przyjęto MIC > 128 mg/l dla FLZ – 256 mg/l, a dla MIC >4 mg/l dla ITZ – 8 mg/l

Tabela 5.5: Lekowrażliwość *Rhodotorula* sp. wyrażona odsetkiem szczepów wykazujących daną wartość MIC. Liczba szczepów (procent) skumulowany procent.

lek	gatunek	MIC [mg/l]											
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
5FC	<i>R. glutinis</i>			5 (83,33) 83,33	0 (0) 83,33	1 (16,67) 100							
	<i>R. minuta</i>			18 (100) 100									
	<i>R. mucilaginosa</i>			61 (100) 100									
AMB	<i>R. glutinis</i>			6 (100) 100									
	<i>R. minuta</i>			16 (88,89) 88,89	2 (11,11) 100								
	<i>R. mucilaginosa</i>			58 (95,08) 95,08	3 (4,92) 100								
FLZ	<i>R. glutinis</i>								1 (16,67) 16,67	2 (33,33) 50	3 (50) 100		-
	<i>R. minuta</i>							3 (16,67) 16,67	6 (33,39) 50	6 (33,33) 88,89	3 (16,67) 100		-
	<i>R. mucilaginosa</i>					2 (3,28) 3,28	0 (0) 3,28	1 (1,64) 4,92	0 (0) 4,92	2 (3,28) 8,20	19 (31,15) 39/34	31 (50,82) 86,88	6 (9,84) 100*
ITZ	<i>R. glutinis</i>	1 (16,67) 16,67	0 (0) 16,67	0 (0) 16,67	1 (16,67) 33,33	3 (50) 83,33	1 (16,57) 100						
	<i>R. minuta</i>	14 (77,78) 77,78	4 (22,22) 100										
	<i>R. mucilaginosa</i>	2 (3,28) 3,28	0 (0) 3,28	0 (0) 3,28	1 (1,64) 4,92	10 (16,39) 21,31	21 (34,43) 55,74	27 (44,27) 100*					

* wartości te są poza stężeniami zastosowanymi w teście.

6 DYSKUSJA

Organizmy na drodze ewolucji przystosowują się do środowiska, w którym bytują. Rozwijane przez nie cechy mają ułatwić im pozyskanie pokarmu, przeżycie i rozmnożenie się. Skrajnym przykładem adaptacji do warunków bytowania są pasożyty bezwzględne np. *Toxoplasma gondii*, które, by zamknąć cykl życiowy, potrzebują żywiciela ostatecznego. Większość grzybów chorobotwórczych człowieka występuje w środowisku naturalnym, najczęściej w glebie, w wodzie, czy w rozkładających się szczątkach materii organicznej, nie wymagając do rozmnażania żywicieli. Duże zdolności adaptacyjne grzybów patogennych pozwalają być im jednocześnie saprofagami i pasożytami w zależności od miejsca i warunków, w jakich akurat się znajdują. Należy pamiętać, że nawet patogenne grzyby są oportunistami, i jak omówiono we wstępie, do zaistnienia grzybicy wymaganych jest wiele czynników. Ważne są nie tylko cechy, które posiada dana komórka grzyba, ale warunki, w jakich bytuje, czyli w tym przypadku kondycja gospodarza. Niektóre grzyby, jak antropofilne dermatofity, zdają się preferować pasożytowanie na człowieku [220].

Nauce znanych jest ok 98000 gatunków grzybów, a szacuje się, że może ich być około 1,5 mln [107]. Tylko kilkaset z tych gatunków było opisanych w przypadkach zakażeń u człowieka [58]. Grzyby patogenne wykształciły szereg cech umożliwiających im przeżycie i rozmnażanie w organizmie żywym. Można przypuszczać, że niektóre, występujące częściej patogeny, są bardziej przystosowane do pasożytniczego trybu życia niż inne, które być może są na początku „drogi” do pasożytnictwa. Rodzą się pytania, które cechy wyróżniają gatunki patogenne na tle gatunków niezdolnych do infekowania. Jakie cechy są koniecznie niezbędne, by grzyb mógł pasożytować w organizmach ssaków? Czym różnią się powszechnie izolowane patogeny jak *C. albicans* od nowo-powstających patogenów takich jak *Rhodotorula*?

Jak wynika z przeglądu ponad 160 opisanych przypadków, rodotoruloza dotyczy przeważnie osób z immunosupresją, choć istnieją też przypadki [108, 123, 138], w których nie stwierdzono upośledzenia odporności. Nasuwa się zatem pytanie, czy i jakie determinanty patogenności charakteryzują szczepy należące do gatunków *Rhodotorula*. Niniejsza rozprawa jest próbą znalezienia odpowiedzi na to zagadnienie. Uzyskane wyniki nie dały jednoznacznej odpowiedzi. Szczepy *Rhodotorula* okazały się zróżnicowane pod

względem obecności i stopnia ekspresji badanych determinant, co zostało omówione poniżej w odniesieniu do dostępnych w literaturze danych.

Okazuje się, że dotychczasowa wiedza na temat patogenności grzybów jest zaledwie wierzchołkiem góry lodowej. Nie znamy w pełni mechanizmów zakażeń *C. albicans*. W literaturze tematu jest wiele prac analizujących występowanie różnych determinant patogenności na poziomie oceny fenotypowej, molekularnej i badań patogenności w modelach zwierzęcych dla różnych grzybów, przede wszystkim najczęściej spotykanych gatunków. Powstaje coraz więcej prac próbujących systematyzować zdobywaną wiedzę [32, 34, 35].

Poznanie cech determinujących patogenność nowo-pojawiających gatunków odpowiedzialnych za grzybice, może przyczynić się do zrozumienia ogólnych mechanizmów zakażeń grzybami. Porównanie z udokumentowanymi patogenami grzybiczymi pozwoli na określenie, które cechy są najistotniejsze w determinowaniu patogenności u grzybów. Poniżej omówione zostały wyniki oceny wybranych determinant patogenności grzybów z rodzaju *Rhodotorula* w odniesieniu do szczepów *C. albicans* izolowanych z różnych przypadków kandydoz.

6.1 Występowanie i charakterystyka szczepów *Rhodotorula*

Niniejsze badania zostały przeprowadzone na szczepach kolonizujących powierzchnię skóry i błon śluzowych człowieka, ze względu na brak dostępu do szczepów z zakażeń uogólnionych opisywanych w rozdziale 2.2 „Chorobotwórczość rodzaju *Rhodotorula*”. W Polsce nie opisano do tej pory żadnego przypadku rodotorulozy uogólnionej.

Hazen stwierdza, że głównym źródłem zakażeń grzybami *Rhodotorula* jest skóra w przeciwieństwie do kandydemii, których źródłem najczęściej są grzyby z rodzaju *Candida* kolonizujące przewód pokarmowy [88]. Zasadnym staje się określenie, jaki odsetek szczepów *Rhodotorula* bytujących na skórze człowieka i w jego bezpośredniej bliskości posiada cechy determinujące ich przejście z komensalicznego do pasożytniczego trybu życia.

6.1.1 Występowanie szczepów *Rhodotorula*

Opisywane w pracach kazuistycznych przypadki rodotorulozy były najczęściej wywoływane przez gatunek *R. mucilaginosa* – 106 (65,4%) spośród 162 przeanalizowanych przypadków. Rzadziej izolowany był *R. glutinis* (23 przypadki – 14,2%) i *R. minuta* (7 przypadków – 4,3 %). Nie udało się ustalić gatunku w 26 przypadkach (16,1%; por. rycina 2.2). W niniejszych badaniach potwierdzono dominację gatunku *R. mucilaginosa*, który izolowany był z 68% materiałów. Częstotliwość izolowania *R. minuta* w prezentowanych badaniach była wyższa niż *R. glutinis*, jednak w opisanych w literaturze tematu przypadkach zakażeń występuje odwrotna sytuacja. Rozbieżność ta wynika najprawdopodobniej z rozpowszechnienia gatunku *R. minuta* w środowisku przy niższej od innych gatunków zdolności infekcji dodatkowo potwierdzonej niższą od *R. mucilaginosa* ekspresją badanych determinant patogenności.

W badaniach Huxley i Hurd na skórze człowieka dominował gatunek *R. mucilaginosa* 79,2%, następnie *R. minuta* 15,6% i *R. glutinis* 5,2%. W próbkach powietrza najczęściej stwierdzanym gatunkiem był *R. minuta* (83,3%), a *R. mucilaginosa* izolowany był w 16,7%. Nie stwierdzono *R. glutinis*. Szczepy *R. mucilaginosa* najczęściej izolowane były z przestrzeni międzypalcowej stóp i rąk [96]. *Rhodotorula* sp. stanowi również 5% izolowanych gatunków grzybów z przestrzeni międzypalcowych stóp [165]. Dane te znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach.

Jennings i Bennet przebadali 8062 rutynowych próbek w kierunku obecności grzybów. *Rhodotorula* obecna była w 57 próbkach, co stanowi 0,71%. Dominował gatunek *R. mucilaginosa* 80,7% następnie *R. minuta* 12,3% i *R. glutinis* 7%. Najczęstszym materiałem, z którego izolowano *Rhodotorula*, był kał, następnie mocz i układ oddechowy (włączając w to ślinę) [98].

6.1.2 Biotypowanie

Biotypowanie pozwala na łączenie szczepów o podobnych cechach w grupy zwane biotypami. Jak przedstawiono w części wstępnej, istnieje szereg różnych metod typowania szczepów. W niniejszej pracy wybrana została rozpowszechniona dla *C. albicans* metoda biotypowania na podstawie profili aktywności enzymatycznej testu API ZYM.

Stwierdzono, że różne biotypy są odpowiedzialne za różne postacie zakażeń *C. albicans*. Wykazano na przykład, że w przypadku kandydozy jamy ustnej dominują biotypy A i F według Williamsona [183].

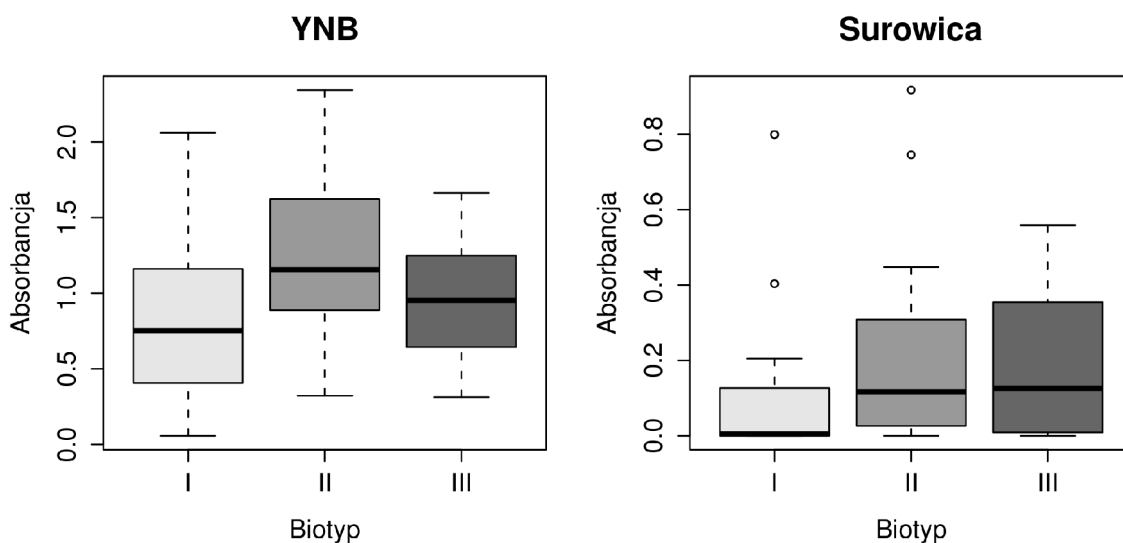
Nie ma określonych biotypów, a tym samym enzymów, na podstawie których można by dokonać biotypowania dla *Rhodotorula*. W niniejszej pracy przyjęto dwa sposoby podejścia ustalenia enzymów przydatnych do biotypowania. Jednym z nich był sposób arbitralnego doboru enzymów, w którym jako kryterium włączające przyjęto częstość występowania aktywności danego enzymu w badanej populacji. Na tej podstawie zostało stwierdzone, że do różnicowania szczepów najlepsze są fosfataza zasadowa oraz α - i β -glukozydaza. Ruiz-Aragón i wsp [200] określili 5 biotypów (wzorów aktywności enzymatycznej) *R. glutinis* na podstawie aktywności arylamidazy cystyny, β -glukozydazy i N-acetyloglukozaminidazy – pozostałe enzymy nie wykazywały zmienności wśród badanych przez nich szczepów. Stwierdzili różnice między szczepami środowiskowymi, pochodzącymi głównie z odchodów gołębi, a szczepami klinicznymi pochodzącymi najczęściej ze skóry pacjentów. Izolaty środowiskowe należały do dwóch biotypów: biotypu „2” - charakteryzującego się aktywnością tylko arylamidazy cystyny (89,4%) i biotypu „5” – niewykazującego aktywności enzymów wykorzystanych do biotypowania (10,6%). Żaden szczep kliniczny nie przynależał do biotypu „2”.

W pracy Wójcik i wsp. profil enzymatyczny uzyskany dla szczepów *R. glutinis* izolowanych ze zbiornika wodnego był znacząco różny od uzyskanego przez Ruiz-Aragon i wsp. Największą zmiennością w badaniach Wójcik i wsp. cechowały się fosfataza zasadowa, arylamidaza waliny oraz α - i β -glukozydazy [248]. Profil uzyskany przez tych autorów zbliżony jest do uzyskanych przez mnie wyników aktywności enzymatycznej *R. glutinis* – rycina 5.9 na str. 47. Różnice w profilach enzymatycznych uzyskanych przez różnych autorów mogą świadczyć o zróżnicowaniu geograficznym szczepów *R. glutinis*.

Innym sposobem ustalenia biotypów, czyli zgrupowania „podobnych” do siebie szczepów grzybów, jest zastosowanie statystycznej metody analizy skupień - klasteryzacji [161]. Metoda klasteryzacji pozwala uwzględnić w definiowaniu biotypu aktywność wszystkich enzymów testu API ZYM. Okazało się, że najlepsze zróżnicowanie na biotypy można uzyskać na podstawie występowania aktywności dwóch enzymów (rycina 5.6 na str. 45). Zastanawiającym jest, dlaczego szczepy *Rhodotorula* wyraźnie różnią się

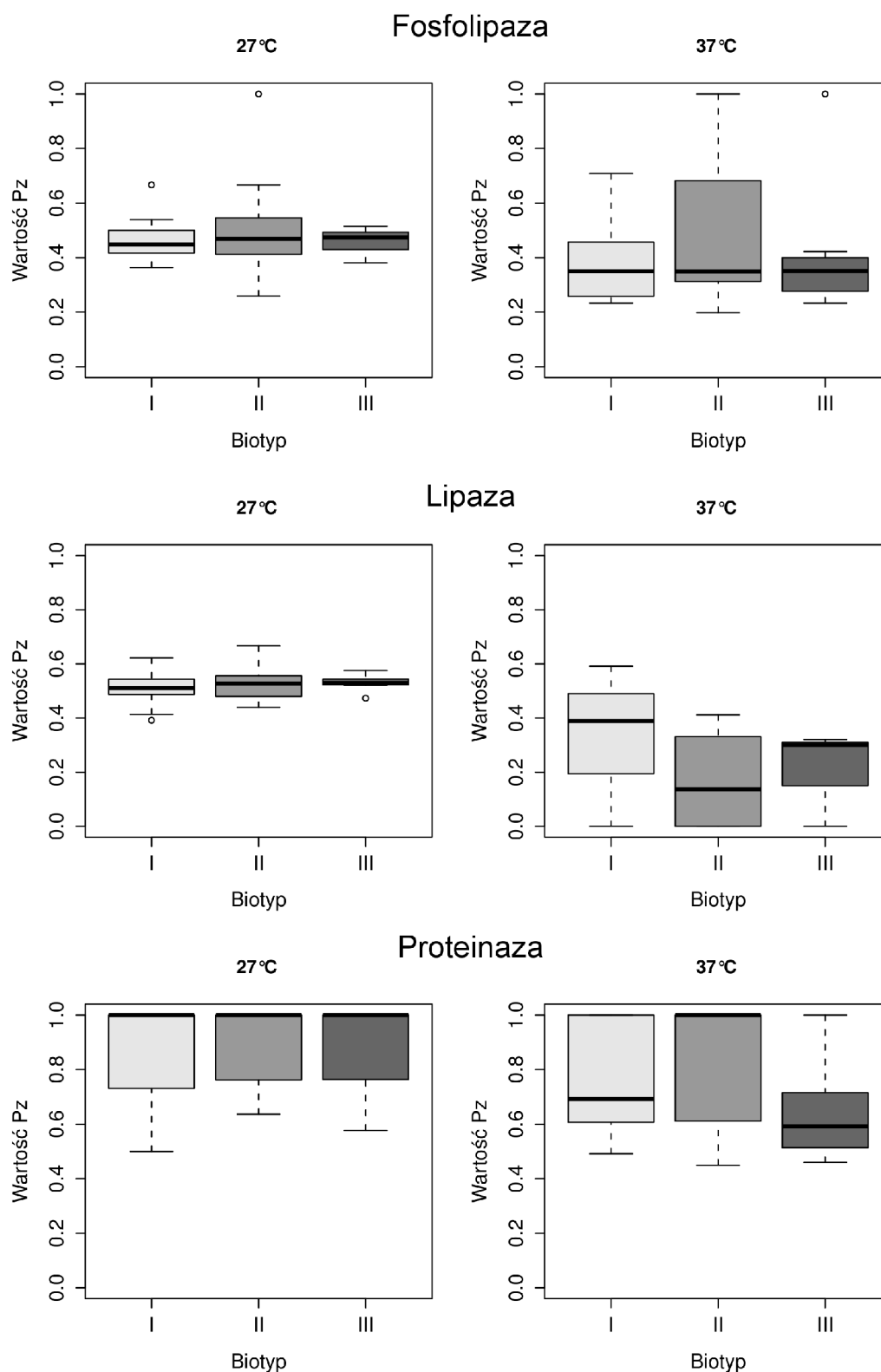
aktywnością α - i β -glukozydazy – enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę dwucukrów powstałych w wyniku degradacji odpowiednio skrobi i celulozy.

Uzyskane biotypy okazały się nieprzydatne w różnicowaniu szczepów pod względem obecności potencjalnych czynników determinujących patogenność. Nie stwierdzono różnic (test Kruskala-Wallisa) między poszczególnymi biotypami w przypadku oceny zdolności wzrostu w 37°C ($p = 0,7880$), oceny przejścia z fazy drożdżowej do mycelialnej ($p = 0,4596$), tworzeniu otoczek ($p = 0,6077$), aktywności fosfolipazy (27°C $p = 0,8910$, 37°C $p = 0,5064$), lipazy (27°C $p = 0,6040$, 37°C $p = 0,4893$) i proteazy (27°C $p = 0,9538$, 37°C $p = 0,2057$) w obu badanych temperaturach, a także w zdolności tworzenia biofilmu zarówno w podłożu YNB ($p = 0,0528$), jak i w surowicy bydlęcej ($p = 0,0774$) – rycina 6.1.



Rycina 6.1: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy należące do różnych biotypów *R. mucilaginosa*.

Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartyłowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające. Dla lepszej czytelności na wykresach zastosowano różne skale – nie można zatem porównywać ich bezpośrednio.



Rycina 6.2: Porównanie aktywności hydrolaz między biotypami *R. mucilaginosa*.

Na wykresie poziomą kreską przedstawiono medianę, ramką – odchylenie kwartylowe, wąsami – zakres danych, kółkami – wartości odstające.

6.2 Tolerancja temperatury

Istotną cechą pozwalającą drobnoustrojom na przeżycie w ludzkim organizmie jest ich termotolerancja w zakresie temperatury ciała człowieka. Cecha ta wydaje się *condicio sine qua non* w grzybicach uogólnionych (głębokich). Wykazano, że mutanty *Cr. neoformans* indukowane promieniowaniem UV, które nie były zdolne do wzrostu *in vitro* w temperaturze 37°C były niepatogenne dla infekowanych myszy [121]. Zauważono różną tolerancję temperatury związaną z patogennością klinicznych szczepów *Sporothrix schenckii*. Izolaty uzyskane ze zmian skórnych rosły słabo w 37°C i były niezdolne do namnażania się w organach wewnętrznych zakażonych myszy, podczas gdy izolaty uzyskane z przypadków rozsianego zakażenia węzłów chłonnych wzrastały w tej temperaturze dobrze i były zdolne do wywołania grzybic głębokich [120]. Również w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zdolność do wzrostu w 42°C różnicuje szczepy kliniczne od standardowych szczepów przemysłowych i laboratoryjnych [48, 143, 144]. Większość gatunków z rodzaju *Rhodotorula* cechuje się brakiem wzrostu w wyższych temperaturach. Zdolność do wzrostu w temperaturze 37°C stwierdzona została wśród szczepów gatunków *R. acuta**, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* oraz zależnie od szczepu u *R. ingeniosa*, *R. minuta* [119].

Jennings i Bennet zbadali zdolność wzrostu w temperaturze 37°C na podłożu SGA 57 klinicznych izolatów. Okazało się, że w tej temperaturze wzrastał 1 na 4 izolaty *R. glutinis*, 6 z 7 izolatów *R. minuta* i 27 z 46 izolatów *R. mucilaginosa* [98].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wzrastały 2 na 3 izolaty *R. glutinis*. Szczepy *R. minuta* w większości przypadków nie wzrastały po inkubacji w podłożu YNB w 37°C. Jednakże wykazywały zdolność przeżycia w tej temperaturze po 5 dniach inkubacji w surowicy. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Jenningsa i Benneta [98] większość badanych szczepów *R. mucilaginosa* wzrastała w 37°C. Dla kilku szczepów *R. mucilaginosa* pomimo braku wzrostu po inkubacji w podłożu YNB stwierdzono średnio obfity lub obfity wzrost uzyskany po inkubacji w surowicy. Oznacza to, że surowica pozwala niektórym szczepom nie tylko na przeżycie, ale i namnożenie się w wyższej temperaturze.

* *R. acuta* według badań opartych na analizie genów cytochromu *b*, jest bardzo blisko spokrewniona z *Sporobolomyces xanthus* [18].

6.3 Aktywność enzymatyczna

W atakowaniu gospodarza ważną rolę odgrywają enzymy hydrolityczne takie jak proteinazy, fosfolipazy i lipazy [78, 97, 113, 149, 210]. Enzymy te są odpowiedzialne za zdolność do niszczenia komórek gospodarza oraz pozyskiwania substancji odżywczych przez pasożyty grzybicze.

6.3.1 Aktywność enzymów w teście API ZYM

Profile enzymatyczne gatunków z rodzaju *Rhodotorula* wykazują spore podobieństwo. Można stwierdzić aktywność arylamidazy leucyny, arylamidazy waliny, fosfatazy kwaśnej oraz fosfohydrolazy naftolu niemal u wszystkich szczepów. Żaden szczep nie wykazuje aktywności lipazy (C14), trypsyny, chymotrypsyny, α - i β -galaktozydazy, β -glukuronidazy i α -fukozydazy. Aktywność esterazy (C4), lipazy-esterazy (C8), arylamidazy cystyny, N-acetylo- β -glukozyloamidazy, α -mannozydazy jest bardzo niska (aktywność 1 lub 2 w przyjętej skali) i stwierdzana u pojedynczych izolatów. Można uznać, że nie ma różnic w aktywności tych enzymów między gatunkami. Należy pamiętać, że enzymy mogą być indukowane przez obecność lub brak substratów, także minimalne różnice w składzie podłoża mogą mieć znaczenie w ocenie aktywności danego enzymu. Do fałszywie pozytywnych wyników może prowadzić też zanieczyszczenie badanego szczepu innymi drobnoustrojami wykazującymi aktywność danego enzymu.

Różnice międzygatunkowe stwierdzono w przypadku aktywności fosfatazy zasadowej, α - i β -glukozydazy. Enzymy te, zostały użyte do biotypowania szczepów *R. mucilaginosa*. Świadczy to o dużej zmienności w aktywności tych enzymów nie tylko na poziomie międzygatunkowym, ale także i w obrębie gatunku.

Brasch i Zaldua sugerują, że fosfataza zasadowa, esteraza i arylamidaza leucyny może być ważna w pasożytniczym wzroście dermatofitów [24]. W przypadku *Rhodotorula* wszystkie szczepy niezależnie od gatunku wykazują wysoką aktywność arylamidazy leucyny (por. rycina 5.12), natomiast esteraza występuje u pojedynczych izolatów. W przypadku aktywności fosfatazy zasadowej okazuje się, że wyższą jej aktywność wykazują rzadziej spotykane w zakażeniach ludzi gatunki *R. minuta* i *R. glutinis* niż

powszechny *R. mucilaginosa* (por. rycina 5.12). Co ciekawe, w badaniach nad aktywnością fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej u szczepów *C. parapsilosis*, wykazano, że większą aktywność tej drugiej wykazują izolaty pochodzące ze zmian powierzchniowych niż głębokich. Wykazano również korelację między aktywnością obu fosfataz a przyleganiem komórek drożdży do komórek nabłonka policzka [67]. W przypadku badanych szczepów *R. mucilaginosa* nie ma różnic w aktywności fosfatazy kwaśnej w zależności od miejsca izolacji: skóry, paznokci, czy innych lokalizacji (test Kruskala-Wallisa, $p = 0,4531$). Aktywność fosfataz u badanych szczepów nie koreluje również ze zdolnością tworzenia biofilmu.

Wykazano, że aktywność α -glukozydazy jest obecna u *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, ale brak jej u *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*. Jednak autorzy nie byli w stanie powiązać aktywności tego enzymu z patogennością, sugerując konieczność dalszych badań porównawczych na modelu mysim [23]. Bramono i wsp. wykazali, że aktywność zewnątrzkomórkowej α -glukozydazy nie zależy od pH i jest indukowana niskim stężeniem substratu – maltozy, aktywność tego enzymu wzrasta również w fazie logarytmicznego wzrostu [22]. Ostatni fakt mógłby wyjaśniać brak aktywności tego enzymu u wolno wzrastającego gatunku *R. minuta*.

6.3.2 Aktywność fosfolipazy

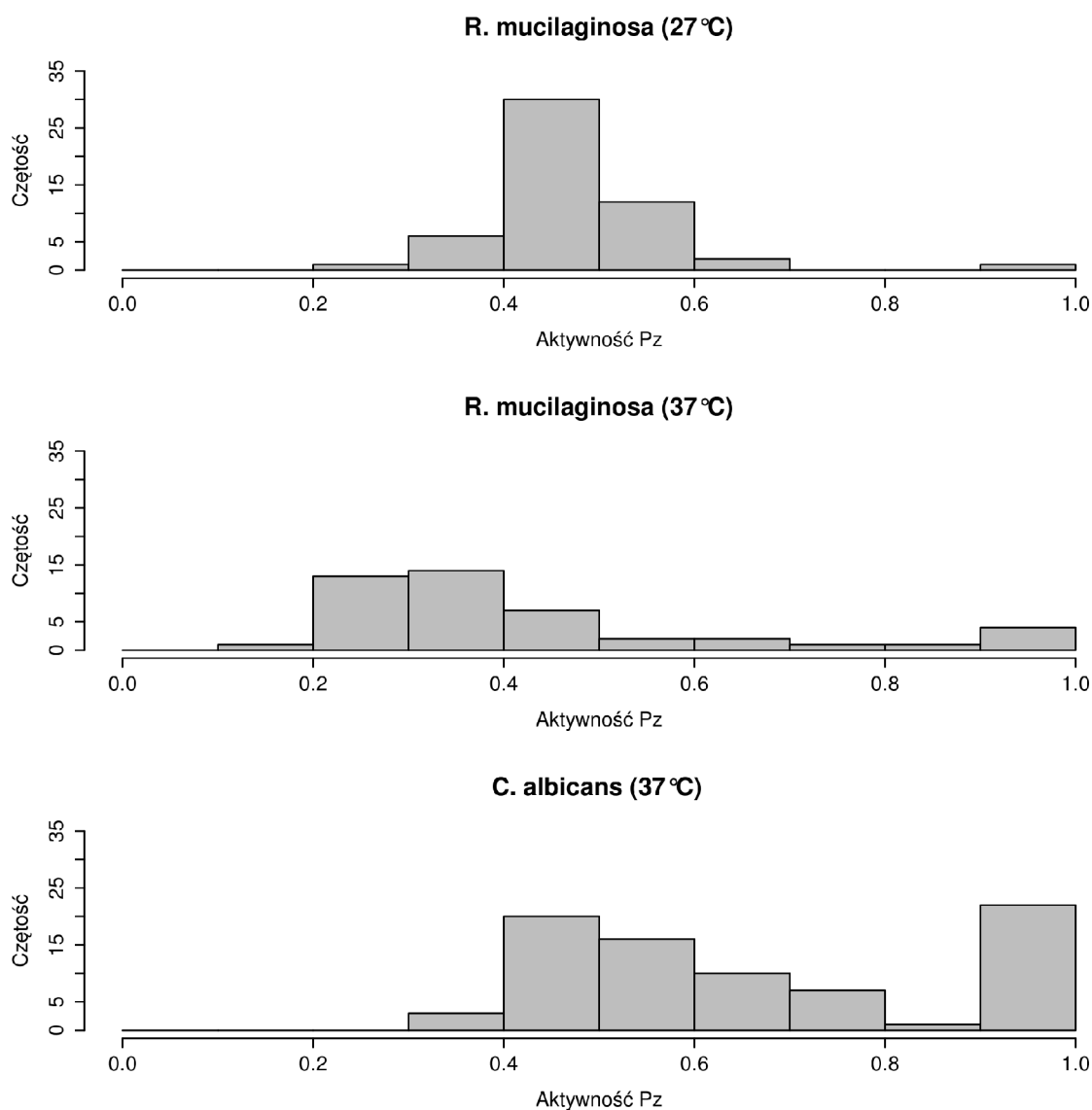
Fosfolipazy to heterogenna grupa enzymów hydrolizująca jedno lub więcej wiązań estrowych w glicerofosfolipidach. Zewnątrzkomórkowe fosfolipazy uważane są za czynnik determinujący patogenność: bakterii, takich jak *Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, grzybów m.in. *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cr. neoformans*, a także pierwotniaków *Toxoplasma gondii* i *Entamoeba histolytica* [210]. Enzym ten odgrywa znaczącą rolę w niszczeniu błon komórkowych i komórek gospodarza. Wytwarzanie dużych ilości fosfolipazy koreluje z wysoką zdolnością adherencji i wysokim wskaźnikiem śmiertelności u zakażonych zwierząt [14, 97]. Również wiele badań wskazuje, że aktywność fosfolipazy jest ważnym czynnikiem w patogenności *Cr. neoformans* [43, 50, 159, 237]. Aktywność fosfolipolityczna stwierdzona została również u *Malassezia furfur* [191].

Uzyskane wyniki oraz wyniki badań Maysera i wsp. [142] wskazują, że *R. mucilaginosa* wykazuje wysoką aktywność fosfolipazy, wyższą niż *C. albicans*. Ponadto Mayser i wsp. stwierdzają dużą liczbę izolatów *C. albicans* niewykazujących aktywności fosfolipazy, co także znalazło potwierdzenie w uzyskanych przeze mnie wynikach.

Cafarchia i wsp., w badaniach nad drożdżami izolowanymi od ptaków, stwierdzili brak aktywności fosfolipazy u izolatów *R. mucilaginosa* pochodzących z kloaki, natomiast aktywność została stwierdzona u 4 na 12 szczepów pochodzących z odchodów gołębi [31]. Mogłoby to potwierdzać teorię, że aktywność fosfolipazy jest związana z kolonizacją człowieka. Jednak rola tego enzymu nie jest do końca jasna [75].

Mayser i wsp. stwierdzili w swoich badaniach, że szczepy niewykazujące aktywności fosfolipazy w 30°C nie wzrastały w 37°C [142]. Nie znalazło to jednak potwierdzenia w niniejszych badaniach. W uzyskanych przeze mnie wynikach tylko jeden szczep nie wykazywał aktywności fosfolipazy w 27°C, ale w 37°C wzrastał, a ponadto aktywność fosfolipazy dla tego szczepu była wysoka - $P_z = 0,32$.

Na rycinie 6.3 przedstawiono histogramy aktywności fosfolipazy wyrażonej współczynnikiem P_z . Wyraźnie widać podział szczepów *C. albicans* na 2 populacje: szczepy wykazujące aktywność fosfolipazy i jej niewykazujące ($P_z = 1$).



Rycina 6.3: Rozkład wartości aktywności fosfolipazy.

Widoczne spłaszczenie wykresu dla *R. mucilaginosa* w temp. 37°C oraz wyraźny rozdział szczepów *C. albicans* na szczepy z aktywnością fosfolipazy i bez aktywności tego enzymu.

6.3.3 Aktywność proteazy

Proteolityczna aktywność *C. albicans* została odkryta w latach 60. przez Staiba [226], a zastosowane przez niego podłoże z różnymi modyfikacjami składu wykorzystywane jest do dzisiaj w celu szybkiego badania przesiewowego szczepów produkujących proteiny należących do różnych gatunków [249].

Izoformy proteiny aspartylowej mają udowodniony udział w determinowaniu patogenności *C. albicans*. Stwierdzono, że Sap1-Sap3 zaangażowane są w niszczeniu tkanek podczas wnikania do nabłonka jamy ustnej człowieka [211]. Wykazano wyższą aktywność proteinaz u izolatów *C. albicans* ze zmian chorobowych jamy ustnej niż u szczepów uzyskanych od zdrowych nosicieli [116, 163]. W modelu komórkowym kandydozy pochwy, wykazano, że najważniejszą rolę odgrywają enzymy Sap1 i Sap2 [209]. Ponadto zauważono, że proteinaza Sap2 może działać na białka układu odpornościowego [152], a Sap4-Sap6 biorą udział w unikaniu niszczenia przez makrofagi, tworzeniu biofilmu i zmianie fenotypu [19, 152]. Rüchel i wsp. stwierdzili, że aktywność proteolityczna innych niepatogennych gatunków *Candida* jest ogólnie niższa, co sugeruje, że patogenność jest bezpośrednio powiązana z aktywnością wytwarzanych proteinaz [199].

W przypadku *Cr. neoformans* wykazano, że szczepy z niską aktywnością proteolityczną powodowały silny odczyn zapalny i były szybko usuwane z zakażonych płuc przez system odporności, natomiast szczepy o wysokiej aktywności proteolitycznej, wzrastały wolniej *in vitro*, powodowały słabą odpowiedź immunologiczną i rozsiewały się poprzez pęcherzyki płucne [42]. Jednakże nie stwierdzono różnic w patogenności szczepów w zależności od ich aktywności proteolitycznej [42]. Rodrigues i wsp. stwierdzili, że proteaza serynowa rozkłada fibronektynę będącą głównym budulcem macierzy międzykomórkowej. Opsonizacja komórek patogenu fibronektyną stymuluje fagocytozę – hydroliza fibronektyny przez proteazę ułatwia uniknięcie fagocytozy przez makrofagi [194].

Ruma-Haynes i wsp. zauważyli, że glukoza zmniejsza wytwarzanie proteazy przez *Cr. neoformans*, co objawia się w słabo widocznych strefach przejaśnienia wokół kolonii [201]. Podobny problem występował w niniejszych badaniach – por. rycina 5.17.

Istnieją badania świadczące o tym, że szczepy *R. glutinis* mogą wytwarzać proteiny [102, 131]. Proteinaza serynowa wytwarzana przez *R. mucilaginosa* jest również znanym alergenem [45]. Nie ma natomiast danych w piśmiennictwie dotyczących aktywności proteazy aspartylowej szczepów *Rhodotorula* w odniesieniu do jej potencjalnego znaczenia w patogenezie grzybic człowieka. Opisano jedynie przypadek zmian skórnych u pacjenta zakażonego wirusem HIV, którego czynnikiem był szczep *R. mucilaginosa* charakteryzujący się aktywnością fosfolipazy, ale brakiem aktywności proteolitycznej [54].

Na podstawie dotychczasowych badań szczepów środowiskowych uważa się, że *R. mucilaginosa* należy do gatunków o raczej niskiej aktywności proteiny [26, 129]. Jak wynika z przeprowadzonych badań, w temperaturze 27°C aktywność proteolityczną wykazuje tylko 1/3 z badanych szczepów, a średni współczynnik $P_z \approx 0,9$. Dla przypomnienia wartość współczynnika $P_z = 1$ oznacza brak aktywności enzymu.

Ponad 40% szczepów nie wzrastało na podłożu testowym w 37°C, chociaż wzrost ten wykazywało w temperaturze 27°C. Jak się okazuje, większość z nierosnących na podłożu do oceny aktywności proteolitycznej szczepów, słabo wzrastało w podłożu YNB/surowicy w 37°C, natomiast 65-70% szczepów wykazujących wzrost średni lub obfity w YNB/surowicy, wzrastało na podłożu BSAA. Różnice są istotne statystycznie (testy Fishera) dla porównań „wzrost słaby” ~ „wzrost średni” $p = 0,0113$, dla „wzrost słaby” ~ „wzrost obfity” $p = 0,0461$. Około 45% z tych szczepów wykazywało aktywność proteolityczną – por. tab. 6.1. Wydaje się zatem, że aktywność proteolityczna może wpływać na zdolność wzrostu w wyższej temperaturze.

Dla porównania, prawie wszystkie szczepy *C. albicans* wykazały aktywność proteolityczną. Co ciekawe nie stwierdza się statystycznie istotnych różnic w poziomie aktywności proteiny dla wzrastających w temp 37°C szczepów *R. mucilaginosa* i *C. albicans*, co świadczy, że jeśli dany szczep *Rhodotorula* wzrasta w 37°C i posiada aktywność proteolityczną, to jest ona porównywalna z aktywnością szczepów *C. albicans*. Wysoka aktywność proteiny aspartylowej znana jest wśród szczepów *Candida* sp. Kumar i wsp. stwierdzili jej obecność u 94,1% badanych szczepów *C. albicans* i 77,2% szczepów *C. tropicalis* [113].

Tabela 6.1: Porównanie intensywności wzrostu w teście tolerancji temperatury i na podłożu do oceny aktywności proteolitycznej w 37°C.

wzrost w teście tolerancji temperaturowej	test aktywności proteiny aspartylowej		
	liczba szczepów wykazująca brak wzrostu	liczba szczepów wykazująca wzrost	liczba szczepów wykazująca aktywność
brak wzrostu (1)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
wzrost słaby (10)	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)
wzrost średni (26)	8 (31%)	18 (69%)	11 (42%)
wzrost obfity (17)	6 (35%)	11 (65%)	8 (47%)

6.3.4 Aktywność lipazy

Do oceny zdolności lipolitycznej zastosowano metodę inkorporacji Tweenów do podłoża stałego. Metoda ta pozwala na szybkie wykrycie szczepów wykazujących aktywność lipazy [70], która objawia się oleistym halo i strefą precypitacji wokół kolonii. Tsubosi i wsp. [232] stwierdzili, że najlepszy wzrost komórek daje podłoże z Tweenem 85, Tweenem 80 i 60. Tweeny 40 i 20 nie powodują wzrostu liczby komórek w podłożu. Aktywność esterazy w ich badaniach dla Tweenu 85 miała maksimum w 48 godzinie hodowli, natomiast dla Tweenu 80 najwyższą wartość osiągnęła w 72 godzinie hodowli. Tween 80 indukuje wydzielanie zewnątrzkomórkowej lipazy.

Aktywność lipolityczna wiązana jest z patogennością grzybów, choć jej rola jest ciągle dyskutowana [72, 210]. Zewnątrzkomórkowa lipaza jest czynnikiem determinującym bytowanie na skórze, rozwój zakażeń powierzchniowych i głębokich przez wiele bakterii m.in. *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* [227]. Badania Ran i wsp. wykazały, że dodanie do podłoża aktywatora lipazy odgrywa ważną rolę we wzroście komórek i indukuje powstawanie strzępek *Malassezia furfur*. Ponadto optimum pH działania tego enzymu jest zbliżone do pH skóry człowieka [187]. Mutanty *Candida parapsilosis* pozbawione genu dla lipazy nie tworzyły biofilmu, były również bardziej podatne na fagocytozę oraz mniej patogenne w mysim modelu zakażenia [71]. Eksperymenty z *C. albicans* pozbawionych genu dla lipazy 8 również wykazały, że szczepy te są mniej patogenne dla myszy [70].

Rhodotorula sp. cechuje się wysoką aktywnością lipazy w 27°C. Temperatura ta odpowiada temperaturze skóry człowieka. Wydaje się zatem, że aktywność lipazy jest cechą przystosowawczą do kolonizacji skóry, jak ma to miejsce u *Malassezia*, czy bakterii np. *S. epidermidis*.

Około 17% szczepów *R. mucilaginosa* wykazywało aktywność lipolityczną w 37°C. Może to świadczyć o heterogeniczności lipazy występującej u *Rhodotorula*. Zwłaszcza że Muderhwa i wsp. wykazali obecność dwóch lipaz charakteryzujących się różnymi optymalnymi pH (4 i 7) i optymalną temp. 45-55°C u szczepu *R. mucilaginosa* [150]. Papaparaskevas i wsp. stwierdzili, że optimum temperatury dla wyizolowanej z *R. glutinis* lipazy wynosi 35°C [169]. Właściwość ta selekcjonuje również szczepy zdolne do powodowania grzybic głębokich.

Nie stwierdzono zależności między aktywnością lipazy a tworzeniem biofilmu, jak miało to miejsce w przypadku, wspomnianych wyżej, badań nad *C. parapsilosis*.

6.4 Zmiana fenotypu

Kurtzman i Fell w *The yeast, a taxonomic study* opisują tworzenie szczątkowej pseudogrzebni w technice płytek Dalmau na podłożach kukurydzianym dla *R. glutinis*, dla *R. mucilaginosa* po miesiącu inkubacji w 19°C stwierdzają brak lub szczątkową pseudogrzebnię zbudowaną z łańcucha wydłużonych komórek. *R. minuta* według tych autorów nie tworzy pseudostrzępek [119].

Uzyskane wyniki potwierdzają brak zdolności tworzenia pseudostrzępek przez szczep *R. minuta*. Żaden z przebadanych szczepów *R. glutinis* nie tworzył pseudostrzępek, jednak zbyt mała ilość szczepów nie pozwala na wyciągnięcie wniosków. W przypadku jednej trzeciej szczepów *R. mucilaginosa* zaobserwowano zdolność tworzenia pseudostrzępek. Pięć procent (n = 3) wszystkich szczepów wykazywało wysoką intensywność tworzenia pseudostrzępek.

Volz i Hunter wykazali, że tworzenie pseudostrzępek zależne jest od światła [238]. Wykonana ocena zmiany fenotypu prowadzona była w ciemności, przez co czynnik ten nie miał wpływu na uzyskane wyniki.

Stwierdzono, że surowica jest najsilniejszym induktorem tworzenia strzępek przez *C. albicans* [115]. Surowica stymulowała również powstawanie strzępek u *Yarrowia lipolytica* [105]. Wydaje się, że podwyższona temperatura inkubacji i surowica stymulują tworzenie pseudostrzępek także u *R. mucilaginosa*.

Tworzenie strzępek jest jedną z determinant patogenności. Wykazano, że szczep *C. albicans* nietworzące strzępek są niepatogenne [132]. Rola tworzenia pseudostrzępek przez *Rhodotorula* w zakażeniach pozostaje nie wyjaśniona. Nie ma badań potwierdzających tworzenia pseudostrzępek przez te grzyby *in vivo*.

6.5 Tworzenie otoczek

Obecność ochronnej otoczki jest czynnikiem patogenności wielu bakterii [101, 55, 228]. Sugeruje się również, że otoczka *Cr. neoformans* chroni komórki tego grzyba przed fagocytozą [20, 253]. Z drugiej strony, wytworzenie otoczki zmniejsza zdolność mikroorganizmów do przylegania do komórek gospodarza [225].

Znane są gatunki grzybów o niskiej wirulencji, które wytwarzają otoczki. Są to inne niż *C. neoformans* gatunki z rodzaju *Cryptococcus* np. *Cr. albidus*. Inne grzyby stwierdzone w zakażeniach ludzi posiadające otoczkoopodobne struktury, które jednak nie zostały dobrze scharakteryzowane to: *Malassezia furfur* [148], *Trichosporon beigeli** [145], *Sporothrix schencki* [74]. Występowanie otoczek zostało stwierdzone u *Tremella mesenterica*, gatunku blisko spokrewnionego z *Cr. neoformans*, ale zupełnie niepatogennego dla ludzi [57].

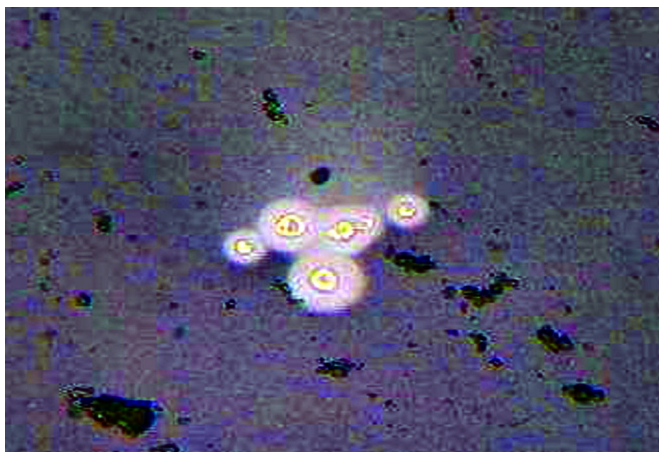
Tworzenie otoczek przez *Rhodotorula* zostało wykazane w badaniach komórek tych drożdży metodami mikroskopii elektronowej. Srivastava i Smith [224], oceniając trzy szczepy *R. mucilaginosa* w TEM, zauważyli, że otoczka jest grubsza, gdy komórki rosną w podłożu z glukozą, niż w podłożach bez glukozy. Występowanie otoczki stwierdzono również u gatunku *R. glutinis* [139]. Wykazano ponadto, że egzopolimery otoczkowe *R. mucilaginosa* odgrywają istotną rolę w usuwaniu i sekwestracji jonów metali [188, 189].

Nie przeprowadzono badań oceniających występowanie otoczek u szczepów klinicznych. Otoczki stwierdzano jedynie przy okazji diagnostyki grzybic u klinicznych izolatów z krwi [1, 2, 25, 64], płynu mózgowo-rdzeniowego [11, 217, 229] oraz z owrzodzenia jamy ustnej [103]. Wszystkie szczepy należały do gatunku *R. mucilaginosa*. Istnieją również informacje o szczepie nietworzącym otoczek. Naveh nie obserwował otoczek w preparacie negatywowym izolatu *R. mucilaginosa* odpowiedzialnego za zapalenie wsierdza [154].

Rodzi się zatem pytanie, czy obecność otoczek występujących u około jednej trzeciej szczepów *R. mucilaginosa* jest przystosowaniem do pasożytnictwa, czy cechą

* *Trichosporon beigeli* został reklasyfikowany jako synonim *T. cutaneum*, jednak nie można jednoznacznie stwierdzić, czy opisywane szczepy tworzące otoczki rzeczywiście przynależały do gatunku *T. cutaneum*.

obecną niezależnie od trybu życia. Zwłaszcza że nie stwierdzono różnic w częstości tworzenia otoczek przez szczepy *R. minuta* i *R. mucilaginosa*. Brakuje również badań na temat występowania otoczek u szczepów bytujących wyłącznie w środowisku naturalnym.



Rycina 6.4: Otoczki *R. mucilaginosa* według Thakur i wsp. 2007 [229].

Oryginalny podpis: preparat w 10% nigrozyne płynu mózgowo-rdzeniowego ukazujący pączkujące komórki z szerokim jasnym halo wokół komórek (x400). url: http://www.ijmm.org/viewimage.asp?img=IndianJMedMicrobiol_2007_25_2_166_32730_1.jpg

6.6 Zdolność tworzenia biofilmu

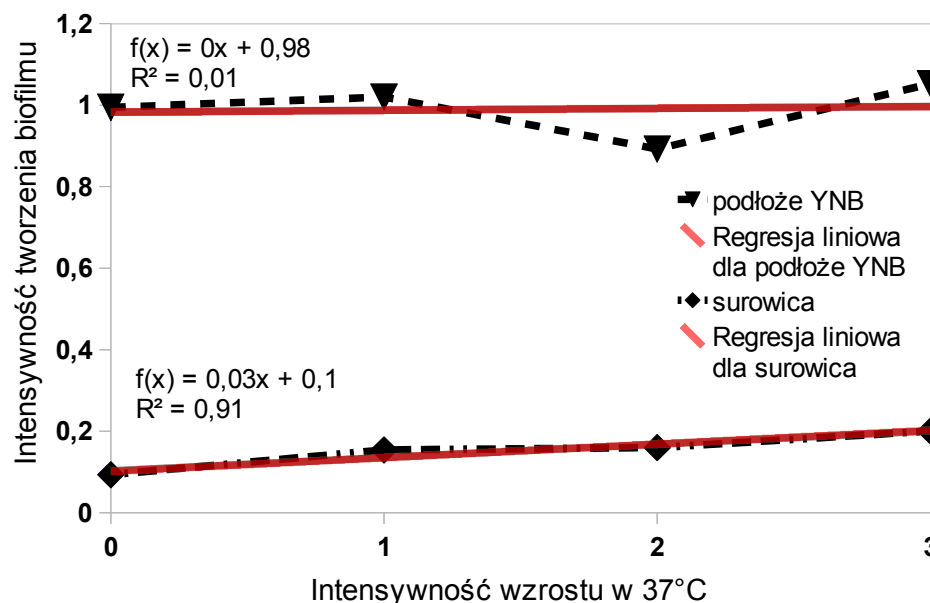
Tworzenie biofilmu pozwala mikroorganizmom na trwałą kolonizację, czy to naturalnych siedlisk np. przewodu pokarmowego, czy też materiałów sztucznie wprowadzonych do organizmu np. cewników. Udowodniono, że szczepy *Haemophilus influenzae* posiadające zdolność tworzenia biofilmu siedmiokrotnie częściej odpowiedzialne były za trwałą kolonizację jamy nosowogardłowej, niż szczepy nieposiadające tej właściwości [213]. Istnieją badania sugerujące, że izolaty *C. albicans* wykazują większą zdolność do tworzenia biofilmu, niż izolaty pozostałych gatunków z rodzaju *Candida* [112]. Tworzenie biofilmu może zwiększać ekspresję innych cech patogenności. Wykazano, że komórki *C. albicans* w biofilmie produkują większe ilości proteiny aspartylowej, niż komórki planktoniczne [146]. Surowica zwiększa zdolność tworzenia biofilmu przez *Candida* sp. [157].

Istnieje wiele metod do oceny tworzenia biofilmu. Są to m.in. metody wizualnej oceny w mikroskopie: pomiary grubości i gęstości biofilmu, ocena suchej masy komórek i macierzy zewnątrzkomórkowej w biofilmie, a także ocena aktywności mitochondrialnej przy użyciu reakcji z XTT. W niniejszej pracy zastosowana została metoda barwienia biofilmu fioletem krystalicznym. Wybór metody związany był z dostępnością i kosztem odczynnika. Metoda oceny tworzenia biofilmu z zastosowaniem fioletu krystalicznego dobrze koreluje z metodą aktywności mitochondrialnej XTT, która wydaje się złotym standardem w badaniach nad biofilmem grzybiczym. Li i wsp. określili współczynnik korelacji obu metod na poziomie 0,96 przy poziomie istotności $p < 0,001$ [128].

Z uzyskanych wyników można wnioskować, że *Rhodotorula* dobrze tworzy biofilm w warunkach sztucznej pożywki. Wszystkie szczepy badane wzrastały mimo zastosowanej temperatury 37°C, w której, jak wiadomo z poprzednich rozdziałów, nie wszystkie szczepy dobrze wzrastały. Nie wykazano korelacji między wzrostem w temperaturze 37°C a średnią wartością tworzenia biofilmu w podłożu YNB, natomiast taka zależność istnieje dla surowicy (por. rycina 6.5).

Można spodziewać się, że *Rhodotorula* charakteryzuje się wysoką zdolnością tworzenia biofilmu przynajmniej w warunkach środowiskowych. Doggett w swojej pracy dotyczącej tworzenia biofilmu w ściekach zauważa, że *R. glutinis* i *R. mucilaginosa* wykazywały największą gęstość występowania w biofilmie wśród drożdży [61]. Obserwowana aktywność biofilmotwórcza *Rhodotorula* w YNB może wynikać z tego zjawiska.

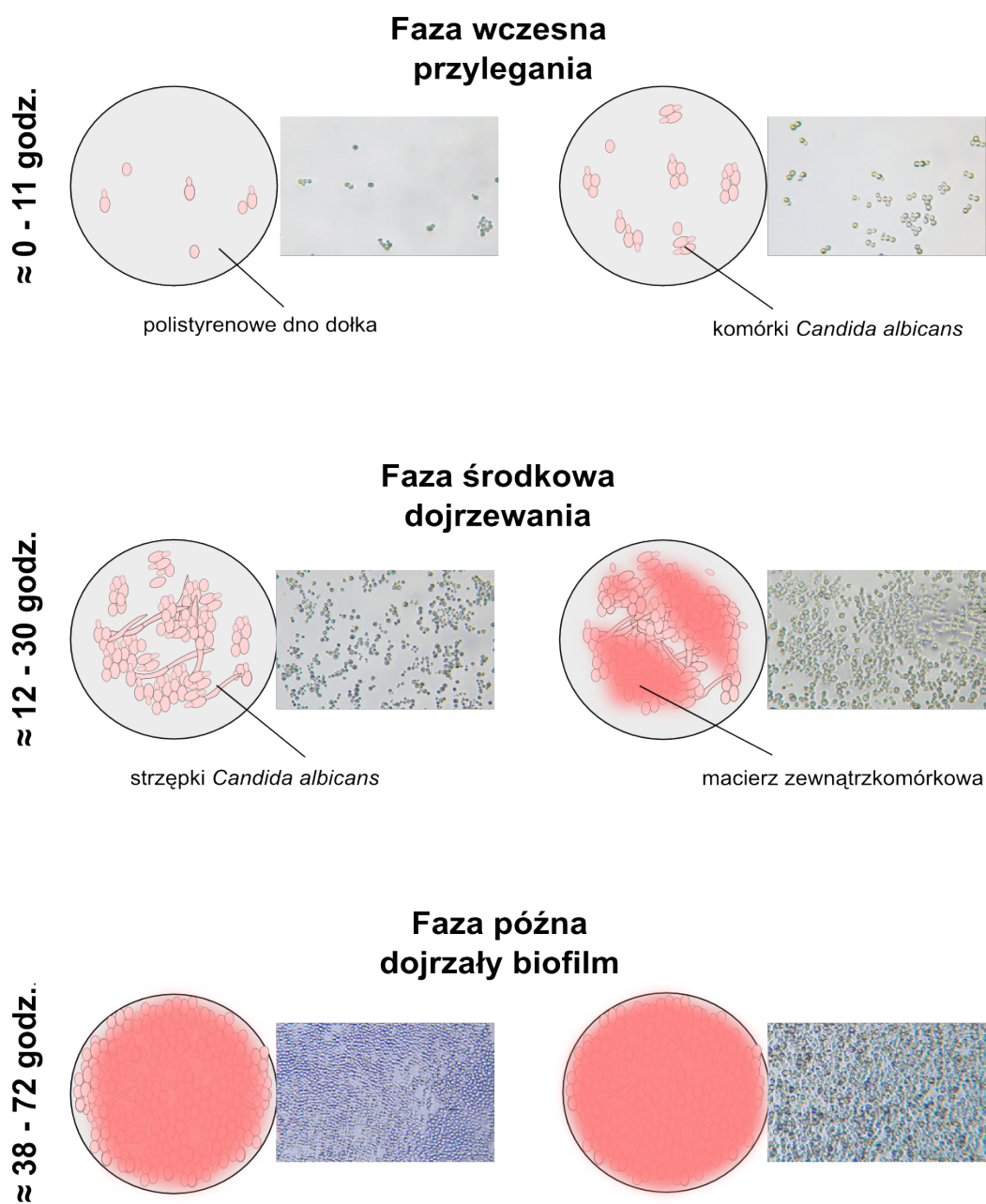
Biorąc pod uwagę zdolność do wzrostu szczepów w surowicy, wydaje się, że odpowiedzialnym za mniejszą zdolność tworzenia biofilmu czynnikiem w tym medium będzie zmniejszona zdolność przylegania. Stoi to jednak w sprzeczności z badaniami Ramage i wsp., którzy wykazali stymulujący wpływ surowicy w czasie fazy przylegania w modelu tworzenia biofilmu przez *Candida dubliniensis* [186], a także badaniami oceniającymi zdolność przylegania *C. albicans* do powierzchni akrylowych [203]. Ciekawe w tym zakresie są badania Nikawa i wsp. stwierdzające większą kolonizację kulek hydroksyloapatytowych przez *Streptococcus mutans* w ślinie i kontroli niż w surowicy w przeciwieństwie do *C. albicans*, która kolonizowała je lepiej w surowicy [156]. Wolne tempo tworzenia biofilmu mogłoby tłumaczyć rozwój fungemii wywołanej *Rhodotorula* dopiero w wyniku długotrwałego utrzymywania cewnika [155].



Rycina 6.5: Zależność między intensywnością wzrostu w 37°C a tworzeniem biofilmu w określonej pożywce.

Szczepki *C. albicans* wykazywały słabe tworzenie biofilmu w warunkach sztucznej pożywki, natomiast zdolność tworzenia biofilmu została diametralnie poprawiona w warunkach inkubacji w surowicy bydlęcej. Związane jest to prawdopodobnie z mechanizmem *phenotyping switching* [122], który w przypadku *C. albicans* objawia się tworzeniem przez komórki w surowicy najpierw tzw. *germ tubes*, a następnie grzybni prawdziwej, zapewniającej szkielet utrzymujący strukturę biofilmu i zapobiegający wypłukaniu komórek [10, 100].

Zastanawiający może być fakt niskiej zdolności tworzenia biofilmu w podłożu YNB z glukozą przez *C. albicans*. Istnieją badania wykazujące, że tylko 42,9% izolatów *C. albicans* pochodzących z krwi wykazuje zdolność tworzenia biofilmu w porównaniu z izolatami z krwi *Candida non-albicans* wykazującymi zdolność tworzenia biofilmu w 93,1% [114]. Stukrotny wzrost aktywności biofilmotwórczej *C. albicans* indukowany surowicą był obserwowany przez Nikawa i wsp. [158, 157]. W moich badaniach szczepki pochodziły głównie z jamy ustnej, pochwy lub przewodu pokarmowego, co może tłumaczyć jeszcze niższy odsetek zdolności do tworzenia biofilmu, niż został zaobserwowany w pracy Kumara i wsp. [114]. Prace Nikawy i wsp. [158, 157] tłumaczą natomiast zaobserwowaną różnicę w zdolności tworzenia biofilmu w surowicy bydlęcej i YNB.



Rycina 6.6: Etapy rozwoju biofilmu.

Część rysunkową przedstawiającą fazy rozwoju biofilmu *C. albicans* opracowano na podstawie pracy Chandra i wsp. [39]. Zdjęcia przedstawiają biofilm różnych szczepów *Rhodotorula* po trzydniowej inkubacji – widoczne jest zróżnicowanie tempa tworzenia biofilmu.

6.7 Lekowrażliwość

Do oznaczenia lekooporności *Rhodotorula* sp. wybrany został komercyjny test ATB Fungus INT 2, ze względu na prostotę wykonania, szybkość i zgodność z metodami zalecanymi przez CLSI. Torres-Rodriguez i Alvarado-Ramirez [231] porównali wyniki oznaczenia lekooporności uzyskane przy pomocy metody CLSI M27-A2 i tego testu. Wykazali wysoką zgodność wyników między obydwoma testami: dla AMB i 5FC – 100%, 97% dla FLZ i 98% dla ITZ.

Brak jest określanych wartości odcięcia* MIC dla *Rhodotorula*. Nie można zatem określić klinicznego różnicowania na szczepy wrażliwe, średniowrażliwe lub odporne na dany antymikotyki. Dane dotyczące *Candida* sp. i *Cr. neoformans* mogą pośrednio wskazywać wartości MIC, które mogą być punktami odcięcia w przypadku *Rhodotorula* sp. Dla 5FC uznaje się, że $MIC \leq 4$ mg/l wskazuje szczepy wrażliwe. Dla AMB nie ma określonych kategorii, ale wartości $MIC \geq 2$ mg/l są uznane za wskazujące oporność. Dlatego można wnioskować, że wśród przebadanych szczepów wszystkie okazały się wrażliwe na te leki. Tylko jeden szczep *R. glutinis* wykazał podwyższoną wartość $MIC = 2$ mg/l dla 5FC. Dwa szczepy *R. minuta* i 3 szczepy *R. mucilaginosa* wykazały podwyższone wartości $MIC = 1$ mg/l dla AMB.

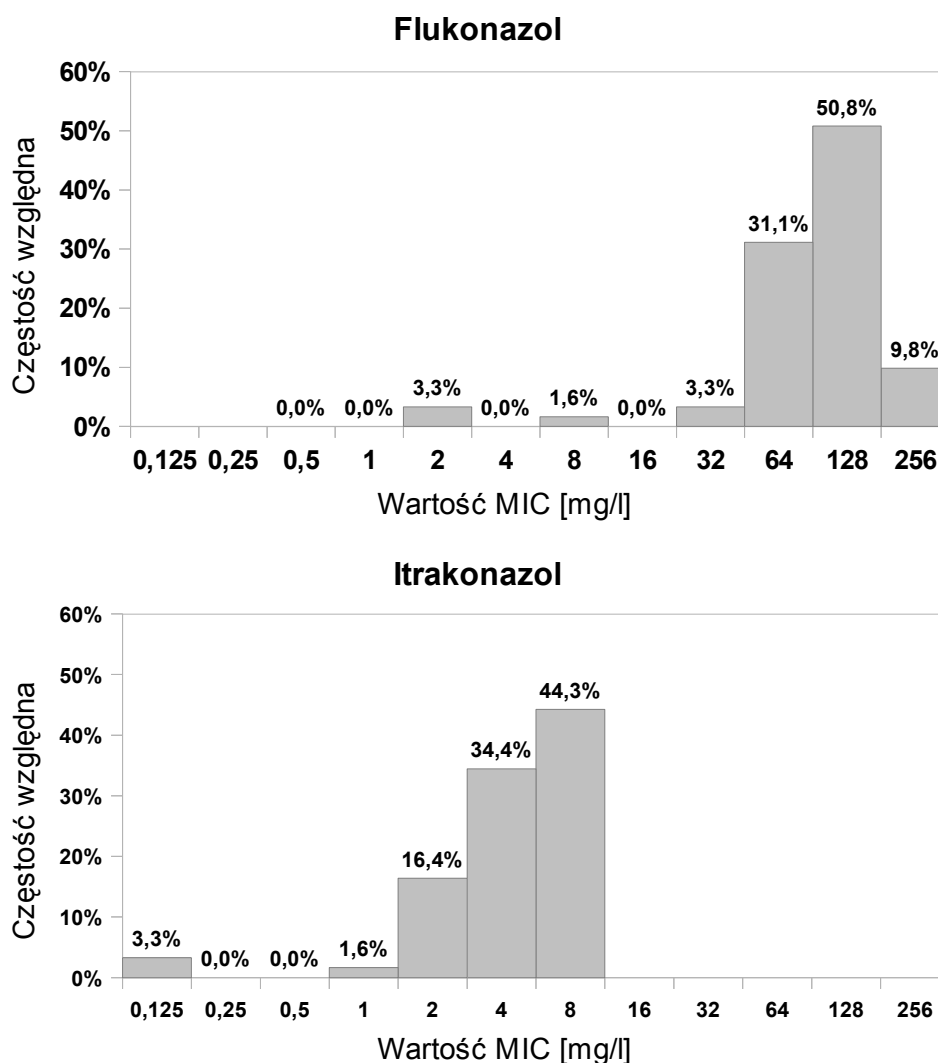
W przypadku FLZ punkt odcięcia oporności na ten lek wynosi ≥ 64 mg/l dla *Candida* sp. i ≥ 16 mg/l dla *Cr. neoformans*. Wartości MIC poniżej 16 mg/l wykazały trzy szczepy *R. minuta* i 3 szczepy *R. mucilaginosa*, a wartości poniżej 64 mg/l trzy szczepy *R. glutinis*, większość szczepów *R. minuta* (n=16).

Zaas i wsp. [251] stwierdził, że AMB lub 5FC i usunięcie cewnika są skuteczną terapią zakażeń *Rhodotorula*. Stwierdzili również, że azole nie są dopuszczalne w terapii. Uzyskane przez mnie wyniki badań *in vitro* potwierdzają te obserwacje. Istnieją jednak doniesienia [108] o skutecznej terapii flukonazolem w przypadku dwóch przypadków zakażeń *R. glutinis*. MIC dla FLZ oznaczony został na poziomie 1,5 mg/l. Szczepy ponadto wykazywały oporność na 5FC ($MIC = 32$ mg/l). W uzyskanych wynikach nie stwierdzono

* Wartościami odcięcia w tym przypadku to wartości decyzyjne pozwalające na zakwalifikowanie danego szczepu ze względu na wrażliwość na lek *in vivo*.

szczepów *R. glutinis* wrażliwych na FLZ, natomiast wrażliwość stwierdzono u trzech szczepów *R. mucilaginosa* (4,92%).

Wydaje się, że naturalna oporność szczepów *Rhodotorula* sp. na azole daje im przewagę w sytuacji, gdy pierwotny patogen zostanie eradykowany lub zahamowany zostanie jego wzrost. Zaobserwowano, że profilaktyka zakażeń grzybiczych z użyciem flukonazolu może sprzyjać rozwojowi zakażeń *Rhodotorula* [79, 106]. Istnieją badania wskazujące, że indukowana oporność na azole w przypadku *C. tropicalis* [12], niektórych szczepów *C. albicans* [81] oraz *Trypanosoma cruzi* [27] skutkowało obniżeniem wirulencji tych szczepów. Możliwe zatem, że również naturalna oporność na azole szczepów *Rhodotorula* jest przyczyną ich niskiej patogenności.



Rycina 6.7: Rozkład wartości MIC dla FLZ i ITZ wśród badanych szczepów *R. mucilaginosa*.

6.8 Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że tylko niektóre z badanych szczepów *Rhodotorula* posiadają cechy uznane powszechnie za determinanty patogenności. Różna jest ekspresja tych cech w porównaniu do szczepów *C. albicans* oraz między poszczególnymi gatunkami. *R. mucilaginosa* wykazuje aktywność fosfolipazy wyższą niż porównywane szczepy *C. albicans*. Szczepy wykazujące aktywność proteolityczną, która jest porównywalna z aktywnością proteolityczną *C. albicans*, stanowią jedną trzecią badanej populacji *R. mucilaginosa*. Niewiele z badanych szczepów (ok. 17%) cechuje się aktywnością lipolityczną, która jest niższa od aktywności lipazy u porównywanych szczepów *C. albicans*. Może to wskazywać na kluczową rolę tego enzymu w zakażeniach grzybiczych.

R. mucilaginosa cechuje się również zdolnością tworzenia biofilmu w surowicy w temperaturze 37°C w płytkach titracyjnych. Ilość tworzonego biofilmu jest jednak znacznie niższa niż u porównywanych szczepów *C. albicans*. Oznacza to, że biofilm *Rhodotorula* wzrasta wolniej w surowicy, co tłumaczyłoby opisywane przypadki fungemii u pacjentów z długoterminowo założonym cewnikiem żylnym. Cechą ułatwiającą zakażenia *Rhodotorula* może być jej oporność na powszechnie stosowane leki azolowe. Szczepy *Rhodotorula* mogą zajmować nisze ekologiczne po gatunkach, które zostały eradykowane w wyniku terapii przeciwgrzybiczej. Choć z drugiej strony istnieją badania wskazujące, że indukcja oporności na FLZ skutkowałą zmniejszeniem patogenności grzybów.

Uzyskane wyniki, wskazujące posiadanie przynajmniej przez pewien odsetek szczepów szeregu cech będących determinantami patogenności grzybów, oraz dane z piśmiennictwa, sugerujące niską patogenność *Rhodotorula*, skłaniają do kontynuacji badań na modelu mysim w celu wykluczenia bądź potwierdzenia patogenności wyselekcjonowanych szczepów.

7 WNIOSKI

- 1) Spośród grzybów z rodzaju *Rhodotorula* w zakażeniach oraz na skórze człowieka dominuje gatunek *R. mucilaginosa*.
- 2) Szczepy *R. mucilaginosa* można różnicować na biotypy na podstawie profili aktywności enzymatycznej testu API ZYM. Jednakże uzyskane w ten sposób biotypy nie korelują z występowaniem determinant patogenności.
- 3) Szczepy *R. mucilaginosa* wykazują duże zróżnicowanie ze względu na posiadanie i ekspresję cech uznawanych za determinanty patogenności:
 - a) Większość szczepów *R. mucilaginosa* wykazuje zdolność do przeżycia i rozmnażania się w surowicy bydlecej w temperaturze 37°C.
 - b) Większość szczepów *R. mucilaginosa* posiada aktywność fosfolipazy wyższą od aktywności fosfolipazy wykazywanej przez porównywane szczepy *C. albicans*.
 - c) Jedna trzecia szczepów wykazuje aktywność proteolityczną. Aktywność proteazy aspartylowej tych szczepów jest porównywalna z aktywnością wykazywaną przez szczepy *C. albicans*.
 - d) Aktywność lipazy w temperaturze 37°C stwierdzona jest tylko u 16,67% szczepów *R. mucilaginosa* ponadto jest ona niższa od aktywności lipazy u porównywanych szczepów *C. albicans*. Może to sugerować kluczową rolę tej cechy jako determinanty patogenności grzybów.
 - e) Niektóre szczepy *R. mucilaginosa* tworzą otoczki i wytwarzają pseudostrzępki w surowicy.
- 4) Większość szczepów *R. mucilaginosa* jest w stanie wytworzyć biofilm w surowicy w temperaturze 37°C w polistyrenowych płytkach titracyjnych, jednakże wielkość biofilmu po 3 dniach inkubacji jest znacznie niższa, niż w przypadku porównywanych szczepów *C. albicans*. Fakt ten może tłumaczyć opisywany w pracach kazuistycznych rozwój fungemii wywołanej przez *Rhodotorula* dopiero po długoterminowym utrzymywaniu cewników żylnych.

- 5) Naturalna oporność szczepów *Rhodotorula* na leki azolowe pozwala im na zajmowanie nisz ekologicznych powstałych w wyniku eradykacji pierwotnych patogenów.
- 6) Uzyskane wyniki skłaniają do podjęcia dalszych badań potwierdzających bądź wykluczających patogenność wyselekcjonowanych szczepów *Rhodotorula* w zwierzęcym modelu badawczym.

8 STRESZCZENIE

W ostatnich latach opisywanych jest coraz więcej przypadków zakażeń grzybami *Rhodotorula*. Najczęstszą postacią rodotorulozy jest grzybica uogólniona (fungemia) a najczęstszym czynnikiem etiologicznym gatunek *R. mucilaginosa*.

Praca miała na celu określenie cech determinujących patogenność grzybów z rodzaju *Rhodotorula* w porównaniu do czynników patogenności *Candida albicans*. W tym celu zbadano zdolność do wzrostu w temperaturze ciała człowieka, aktywność wybranych enzymów, tworzenie otoczek, zmianę fenotypu oraz zdolność do tworzenia biofilmu. Ponadto dokonano oceny wrażliwości na podstawowe leki przeciwgrzybicze oraz podjęto próbę biotypowania szczepów w oparciu o test API ZYM.

Badania zostały przeprowadzone na izolatach pochodzących od pacjentów oraz z próbek środowiskowych badanych w Zakładzie Mykologii.

Stwierdzono znaczne zróżnicowanie szczepów ze względu na posiadanie determinant patogenności.

Wykazano, że większość szczepów wzrasta w temperaturze ciała człowieka. *R. mucilaginosa* wykazuje wyższą aktywność fosfolipazy w 37°C niż *C. albicans*. Jedna trzecia szczepów wykazuje aktywność proteolityczną. Aktywność proteazy aspartylowej tych szczepów jest porównywalna z aktywnością wykazywaną przez szczepy *C. albicans*. Aktywność lipazy w temperaturze 37°C stwierdzona została tylko u 16,67% szczepów *R. mucilaginosa* ponadto jest ona niższa od aktywności lipazy u porównywanych szczepów *C. albicans*.

Tylko niektóre szczepy *R. mucilaginosa* tworzą otoczki i wytwarzają pseudostrzępki w surowicy. Większość szczepów *R. mucilaginosa* jest w stanie wytworzyć biofilm w surowicy w temperaturze 37°C w polistyrenowych płytkach titracyjnych, jednakże wielkość biofilmu po 3 dniach inkubacji jest znacznie niższa, niż w przypadku porównywanych szczepów *C. albicans*. Fakt ten może tłumaczyć opisywany w pracach kazuistycznych rozwój fungemii wywołanej przez *Rhodotorula* dopiero po długoterminowym utrzymywaniu cewników żylnych.

Wykazano wysokie wartości MIC dla szczepów *R. mucilaginosa* na flukonazol i itraconazol. Wykazano brak przydatności biotypowania w różnicowaniu szczepów posiadających determinanty patogenności na podstawie enzymogramów testu API ZYM.

9 SUMMARY

In the recent years more and more cases of *Rhodotorula* infection are reported. Deep mycosis (fungaemia) is the most frequent form of rhodothorulosis and the most common aetiological agents is the species *R. mucilaginosa*.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of virulence factor of *Rhodotorula* strains in comparison to known human pathogen *Candida albicans*. For that purpose the ability to grow in body temperature, activity of selected enzymes, capsule production, change of the phenotype and the ability to form a biofilm were investigated. Moreover antifungal drug susceptibility test was performed and a trial to biotype the strains with API ZYM test was performed.

The study was carried out on isolates from patients and environmental samples tested in the Department of Mycology.

There was a wide diversity in the expression of virulence factors in *Rhodotorula* strains.

It has been shown that most strains had the ability to grow in body temperature. *R. mucilaginosa* has a higher phospholipase activity of at 37°C than *C. albicans*. One-third of the strains of *R. mucilaginosa* has proteolytic activity. The aspartyl protease activity of these strains was comparable to the activity exhibited by the *C. albicans* strains. The lipase activity at 37°C was found in only 16.67% of *R. mucilaginosa* strains moreover this activity was also lower than the lipase activity in the compared *C. albicans* strains.

Only some strains of *R. mucilaginosa* produce capsules and pseudohyphae in the serum. Most strains of *R. mucilaginosa* are able to produce the biofilm in serum at 37°C in polystyrene microplates, but the size of the biofilm after three days incubation is significantly lower than in the compared strains of *C. albicans*. This may explain the case studies of fungemia due to *Rhodotorula* during maintenance of long-term venous catheters.

High MICs have been shown for strains of *R. mucilaginosa* to fluconazole and itraconazole. Biotyping on the base of enzymograms of API ZYM test are useless in differentiation of strains.

10 SPIS PIŚMIENICTWA

- 1 Ahmed A., Aggarwal M., Chiu R., Ramratnam B., Rinaldi M., Flanigan T.P.: A fatal case of *Rhodotorula* meningitis in AIDS. *Medicine and Health, Rhode Island*. 1998; 81: 22-23
- 2 Alliot C., Desablens B., Garidi R., Tabuteau S.: Opportunistic infection with *Rhodotorula* in cancer patients treated by chemotherapy: two case reports. *Clinical Oncology*. 2000; 12: 115-117
- 3 Alothman A.: *Rhodotorula* species peritonitis in a liver transplant recipient: a case report. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2006; 17: 47-49
- 4 Álvarez M.H., Garnero D.B., Del Palacio Hernánz A., Villares J.M.M.: *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in a child on long-term parenteral nutrition. *Nutritional Therapy and Metabolism*. 2008; 26: 144-147
- 5 Anaissie E., Bodey G.P., Kantarjian H., Ro J., Vartivarian S.E., Hopfer R., Hoy J., Rolston K.: New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Reviews of Infection Diseases*. 1989; 11: 369-378
- 6 Anaissie E.J., Bodey G.P., Rinaldi M.G.: Emerging fungal pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1989; 8: 323-330
- 7 Anatoliotaki M., Mantadakis E., Galanakis E., Samonis G.: *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. *Clinical Laboratory*. 2003; 49: 49-55
- 8 Antal Z., Kredics L., Pakarinen J., Dóczy I., Andersson M., Salkinoja-Salonen M., Manczinger L., Szekeres A.: Comparative study of potential virulence factors in human pathogenic and saprophytic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2005; 52: 341-350
- 9 Asim M., Meigh J.A., Farr M.J.: Fungal peritonitis caused by *Candida parapsilosis* and subsequently *Rhodotorula glutinis* in a CAPD patient. *Peritoneal Dialysis International*. 1999; 19: 183
- 10 Baillie G.S., Douglas L.J.: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 1999; 48: 671-679
- 11 Baradkar V.P., Kumar S.: Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2008; 11: 245-247
- 12 Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., Di Francesco L.F., Caselli F., Giannini D., Giacometti A., Gavaudan S.: Experimental induction of

- fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 1578-1584
- 13 Barnett J.A.: A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast (Chichester, England)*. 2004; 21: 1141-1193
- 14 Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R.G., Ryley J.F.: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology*. 1985; 131: 1217-1221
- 15 Bawazeer A.M., Hodge W.G.: Rhodotorula infection in a corneal graft following penetrating keratoplasty. *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien D'ophtalmologie*. 2003; 38: 225-227
- 16 Benevent D., Peyronnet P., Lagarde C., Leroux-Robert C.: Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron*. 1985; 41: 203-206
- 17 Bibashi E., Memmos D., Kokolina E., Tsakiris D., Sofianou D., Papadimitriou M.: Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36: 927-931
- 18 Biswas S.K., Yokoyama K., Nishimura K., Miyaji M.: Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51: 1191-1199
- 19 Borg-von Zepelin M., Beggah S., Boggian K., Sanglard D., Monod M.: The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Molecular Microbiology*. 1998; 28: 543-554
- 20 Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G., Doering T.L.: A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2003; 2: 655-663
- 21 Bowman B.H., Taylor J.W., White T.J.: Molecular evolution of the fungi: human pathogens. *Molecular Biology and Evolution*. 1992; 9: 893-904
- 22 Bramono K., Tsuboi R., Ogawa H.: A carbohydrate-degrading enzyme from *Candida albicans*: correlation between α -glucosidase activity and fungal growth. *Mycoses*. 1995; 38: 349-353
- 23 Bramono K., Yamazaki M., Tsuboi R., Ogawa H.: Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2006; 59: 73-76

- 24 Brasch J., Zaldua M.: Enzyme patterns of dermatophytes. *Mycoses*. 1994; 37: 11-16
- 25 Braun D.K., Kauffman C.A.: Rhodotorula fungaemia: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. *Mycoses*. 1992; 35: 305-308
- 26 Brizzio S., Turchetti B., de García V., Libkind D., Buzzini P., van Broock M.: Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*. 2007; 53: 519-525
- 27 Buckner F.S., Wilson A.J., White T.C., Van Voorhis W.C.: Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42: 3245-3250
- 28 Budak A.: Epidemiology of *Candida* infection. II. Application of biochemical methods for typing of *Candida albicans* strains. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 1990; 38: 369-377
- 29 Bush L.M., Chaparro-Rojas F., Perez M.T.: Rhodotorula and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* native hip joint septic arthritis and osteomyelitis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2009; 17: 397-398
- 30 Butler G., Rasmussen M.D., Lin M.F., Santos M.A.S., Sakthikumar S., Munro C.A., Rheinbay E., Grabherr M.: Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009; 459: 657-662
- 31 Cafarchia A., Romito D., Coccioli C., Camarda A., Otranto D.: Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Medical Mycology*. 2008; 46: 429-434
- 32 Calderone R.A. F.W.: Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9: 327-335
- 33 Casadevall A., Perfect J.R.: *Cryptococcus neoformans*. ASM Press; 1998
- 34 Casadevall A., Pirofski L.A.: Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *Journal of Water and Health*. 2009; 7, supl. 1: 2-18
- 35 Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 1999; 67: 3703-3713
- 36 Casadevall A., Steenbergen J.N., Nosanchuk J.: 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6: 332-337

- 37 Casolari C., Nanetti A., Cavallini G.M., Rivasi F., Fabio U., Mazzoni A.: Keratomycosis with an unusual etiology (*Rhodotorula glutinis*): a case report. *Microbiologica*. 1992; 15: 83-87
- 38 Cerikcioglu N., Tetik C., Mulazimoglu L.: *Rhodotorula minuta*: uncommon yeast isolated as the causative agent of a right hip joint infection. *Journal de Mycologie Médicale*. 2005; 15: 52-55
- 39 Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A.: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*. 2001; 183: 5385-5394
- 40 Chao T.Y., Kuo C.C., Hseuh E.J., Yang Y.F., Wang C.C.: Diagnosis of fungemia in bone marrow transplantation patients by examination of peripheral blood smears.. *Bone Marrow Transplantation*. 1994; 14: 647-649
- 41 Chen C.M., Ho M.W., Yu W.L., Wang J.H.: Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients: effect of fluconazole treatment and use of the twin-bag disconnect system. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran za Zhi*. 2004; 37: 115-120
- 42 Chen L.C., Casadevall A.: Variants of a *Cryptococcus neoformans* strain elicit different inflammatory responses in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999; 6: 266-268
- 43 Chen S.C., Muller M., Zhou J.Z., Wright L.C., Sorrel T.C.: Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *The Journal of Infectious Diseases*. 1997; 175: 414-420
- 44 Cherubin C.E., Neu H.C.: Infective endocarditis at the Presbyterian Hospital in New York City from 1938–1967. *The American Journal of Medicine*. 1971; 51: 83-96
- 45 Chou H., Tam M.F., Lee S.S., Tai H.Y., Chang C.Y., Chou C.T., Shen H.D.: A vacuolar serine protease (Rho m 2) is a major allergen of *Rhodotorula mucilaginosa* and belongs to a class of highly conserved pan-fungal allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2005; 138: 134-141
- 46 Chung J.W., Kim B.N., Kim Y.S.: Central venous catheter-related *Rhodotorula rubra* fungemia. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2002; 8: 1437-7780
- 47 Cleary J.D., Oswald T.M., Rogers P.D., Whitehurst A.: A high-dosage fluconazole therapy in a patient with *Rhodotorula pilimanae* fungemia. *Journal of Infectious Disease Pharmacotherapy*. 2000; 4: 75-85

- 48 Clemons K.V., McCusker J.H., Davis R.W., Stevens D.A.: Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Infectious Diseases*. 1994; 169: 859-867
- 49 Colombo A.L., Dantas L.S., Abramczyk M.L., Cypriano M., Fischman O., Iazzetti A.V., Petrilli A.S., Selijan M.P.: *Rhodotorula glutinis* fungemia: a case report and literature review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 1997; 1: 204-207
- 50 Cox G.M., McDade H.C., Chen S.C., Tucker S.C., Gottfredsson M., Wright L.C., Sorrell T.C., Leidich S.D.: Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 2001; 39: 166-175
- 51 Cure-Ruiz N., Cardona-Zorilla A.F.: Isolation of *Rhodotorula* sp. in a critically ill patient. Description of a case and review of literature. *Infectio. Revista de la Asociacion Colombiana de Infectologia*. 2001; 5: 179-182
- 52 Cutrona A.F., Shah M., Himes M.S., Miladore M.A.: *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N.J.)*. 2002; 31: 137-140
- 53 da Cunha M.M.L., dos Santos L.P.B., Dornelas-Ribeiro M., Vermelho A.B., Rozental S.: Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009; 55: 396-403
- 54 da Silva B.C.M., Gambale W., Auler M.E., Dos Santos J.I., Lagonegro E.R., Paula C.R.: *Rhodotorula rubra* causing skin lesions in a HIV positive patient. *Journal de Mycologie Medicale*. 2001; 11: 149-152
- 55 Daffé M., Etienne G.: The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*. 1999; 79: 153-169
- 56 Datry A., Dombet H., Hilmarisdottir I., Leblond V., Lecso G., Palous M., Danis M., Binet J.L.: Septicémie à *Rhodotorula glutinis* chez une patiente en aplasie thérapeutique [*Rhodotorula glutinis* septicemia in a patient with therapeutic aplasia]. *Bulletin de la Société française de mycologie médicale*. 1988; 17: 325-328
- 57 De Baets S., Du Laing S., Francois C., Vandamme E.J.: Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2002; 29: 181-184

- 58 de Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi. ASM Press; 2001
- 59 de Zoysa J.R., Searle M., Lynn K.L., Robson R.A.: Successful treatment of CAPD peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 2001; 21: 627-628
- 60 Dodge C.W.: Medical mycology. Fungus diseases of men and other mammals. The C.V. Mosby Company; 1935
- 61 Doggett M.S.: Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 1249-1251
- 62 Donald F.E., Sharp J.F., Firth J.L., Crowley J.L., Ispahani P.: *Rhodotorula rubra* ventriculitis. *The Journal of Infection*. 1988; 16: 187-191
- 63 Eisenberg E., Alpert B., Weiss R., Mittman N., Soeiro R.: *Rhodotorula rubra* peritonitis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *The American Journal of Medicine*. 1983; 75: 349-352
- 64 El-Tahawy A.T.A., Khalaf R.M.F.: *Rhodotorula rubra* fungemia in an immunocompromised patient. *Annals of Saudi Medicine*. 1999; 19: 533-535
- 65 Elias M.L., Soliman A.K., Mahoney F.J., Al-Zahraa A., El-Din K., El-Kebbi R.A.H., Ismail T.F.M., Wasfy M.M.O.: Isolation of *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* and *Nocardia* from meningitis patients in Egypt. *Journal of Egyptian Public Health Association*. 2009; 84: 169-181
- 66 Fanci R., Pecile P., Martinez R.L., Fabbri A., Nicoletti P.: Amphotericin B treatment of fungemia due to unusual pathogens in neutropenic patients: Report of two cases. *Journal of Chemotherapy*. 1997; 9: 427-430
- 67 Fernanado P.H., Panagoda G.J., Samaranayake L.P.: The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 1999; 107: 1034-1042
- 68 Fresenius G.: Beiträge zur Mykologie. Erstes Heft. Brönnner: Frankfurt.; 1850
- 69 Fung H.B., Martyn C.A., Shahidi A., Brown S.T.: *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009; 13: 27-29

- 70 Gácsér A., Stehr F., Kröger C., Kredics L., Schäfer W., Nosanchuk J.D.: Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 2007; 75: 4710-4718
- 71 Gácsér A., Trofa D., Schäfer W., Nosanchuk J.D.: Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117: 3049-3058
- 72 Gaillardin C.: Lipases as pathogenicity factors of fungi. W: Timmis K.N., McGenity T., Meer J.R.V.D., Lorenzo V.D. [red.]. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer Berlin Heidelberg 2010, ss. 3259-3268
- 73 García-Suárez J., Gómez-Herruz P., Cuadros J.A., Burgaleta C.: Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. *Mycoses*. 2010; : in press
- 74 Garrison R.G., Mirikitani F.K.: Electron cytochemical demonstration of the capsule of yeast-like *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia*. 1983; 21: 167-170
- 75 Ghannoum M.A.: Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13: 122-143
- 76 Giammanco G.M., Lopes M.M., Coimbra R.S., Pignato S., Grimont P.A.D., Grimont F., Freitas G., Giammanco G.: Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 483-490
- 77 Gogate A.A., Deodhar L.L., Gogate S.S.: Hydrosalpinx due to *Rhodotorula glutinis* (a case report). *Journal of Postgraduate Medicine*. 1987; 33: 34
- 78 Gokce G., Cerikcioglu N., Yagci A.: Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*. 2007; 164: 265–269
- 79 Goldani L.Z., Craven D.E., Sugar A.M.: Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. *Medical Mycology*. 1995; 33: 267-270
- 80 Goyal R., Das S., Arora A., Aggarwal A.: *Rhodotorula mucilaginosa* as a cause of persistent femoral nonunion. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2008; 54: 25-27
- 81 Graybill J.R., Montalbo E., Kirkpatrick W.R., Luther M.F., Revankar S.G., Patterson T.F.: Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42: 2938-2942

- 82 Gregory J.K., Haller J.A.: Chronic postoperative Rhodotorula endophthalmitis. *Archives of Ophthalmology*. 1992; 110: 1686-1687
- 83 Guerra R., Cavallini G.M., Longanesi L., Casolari C., Bertoli G., Rivasi F., Fabio U.: Rhodotorula glutinis keratitis. *International Ophthalmology*. 1992; 16: 187-190
- 84 Gyaurgieva O.H., Bogomolova T.S., Gorshkova G.I.: Meningitis caused by Rhodotorula rubra in an HIV-infected patient. *Medical Mycology*. 1996; 34: 357-359
- 85 Harrison F.C.: Cheese torulae. *Transactions of the Royal Society of Canada*. 1927; 21: 341-380
- 86 Harrison F.C.: A systematic study of some torulae. *Transactions of the Royal Society of Canada*. 1928; 22: 187-225
- 87 Hasegawa T., Banno I., Yamauchi S.: A taxonomic study on the genus Rhodotorula. The subgenus Rubrotorula nov. subgen. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1960; 5: 200-213
- 88 Hazen K.C.: New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8: 462-478
- 89 Henderson B., Poole S., Wilson M.: Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological Reviews*. 1996; 60: 316-341
- 90 Hong H.K., Kim Y.M., Kim S.D., Bae C.W., Lee H.J.: A case of Rhodotorula mucilaginosa peritonitis undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis in a neonate with acute renal failure. *The Journal of the Korean Society for Neonatology*. 2003; 10: 94-98
- 91 Honkanen E., Yon Bonsdorf M., Hortling L.: Rhodotorula peritonitis continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International*. 1983; 3: 216-217
- 92 Hsueh P.R., Teng L.J., Ho S.W., Luh K.T.: Catheter-related sepsis due to Rhodotorula glutinis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 857-859
- 93 Hunter P.R., Fraser C.: Use of modified resistogram to type Candida albicans isolated from cases of vaginitis and from faeces in the same geographical area. *Journal of Clinical Pathology*. 1987; 40: 1159-1161
- 94 Hunter P.R., Fraser C.A.M., Mackenzie D.W.R.: Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *Journal of Medical Microbiology*. 1989; 28: 85-91
- 95 Huttova M., Kralinsky K., Horn J., Marinova I., Iligova K., Fric J., Spanik S., Filka J.: Prospective study of nosocomial fungal meningitis in

- children - report of 10 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1998; 30: 485-487
- 96 Huxley M., Hurd R.C.: Pink yeasts isolated from human skin surfaces. *Journal of Bacteriology*. 1956; 71: 492-493
- 97 Ibrahim A.S., Mirbod F., Filler S.G., Banno Y., Cole G.T., Kitajima Y., Edwards J.E.J., Nozawa Y.: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 1995; 63: 1993-1998
- 98 Jennings A.E., Bennett J.E.: The isolation of red yeast-like fungi in a diagnostic laboratory. *Journal of Medical Microbiology*. 1972; 5: 391-394
- 99 Jiménez-Mejías M.E., Ortiz-Leyba C., Jiménez-Gonzalo F.J., del Nozal M., Campos T., Jiménez-Jiménez F.J.: Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in relation to total parenteral nutrition. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1992; 10: 543-546
- 100 Jin Y., Samaranayake Y.H., Yip H.K., Samaranayake L.P.: Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2005; 160: 191-200
- 101 Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W.: The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6: 288-301
- 102 Kamada M., Ode K., Murao S.: The purification of the extracellular acid protease of *Rhodotorula glutinis* K24 and its general properties. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1972; 36: 1095-1101
- 103 Kaur R., Wadhwa A., Agarwal S.K.: *Rhodotorula mucilaginosa*: an unusual cause of oral ulcers in AIDS patients. *AIDS (London, England)*. 2007; 21: 1068-1069
- 104 Kiehn T.E., Gorey E., Brown A.E., Edwards F.F., Armstrong D.: Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clinical Infectious Diseases*. 1992; 26: 841-846
- 105 Kim J., Cheon S.A., Park S., Song Y., Kim J.Y.: Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 190: 9-12
- 106 Kiraz N., Gülbas Z., Akgün Y.: Case report. *Rhodotorula rubra* fungaemia due to use of indwelling venous catheters. *Mycoses*. 1999; 43: 209-210

- 107 Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A.: Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi. CABI; 2008
- 108 Kofteridis D., Mantadakis E., Christidou A., Samonis G.: Rhodotorula glutinis fungemia successfully treated with fluconazole: report of two cases. *International Journal of Infectious Diseases*. 2007; 11: 179-180
- 109 Krajewska-Kułak E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Bartoszewicz M., Roszkowska I., Szczurzewski M., Trybuła J.: Biotypy enzymatyczne szczepów grzybów drożdżopodobnych izolowanych z różnych ontocenoz. *Mikologia Lekarska*. 2001; 8: 13-17
- 110 Kreger-Van Rij N.J.W.: The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier; 1984
- 111 Krzyściak P., Halska A., Macura A.B.: Występowanie i chorobotwórczość grzybów *Rhodotorula* sp. *Postępy Mikrobiologii*. 2007; 46: 291-300
- 112 Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*. 2002; 70: 878-888
- 113 Kumar C.P.G., Kumar S.S.J., Menon T.: Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia*. 2006; 161: 213-218
- 114 Kumar C.P.G., Menon T.: Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Medical Mycology*. 2006; 44: 99-101
- 115 Kuo A., Agabian N.: Mammalian serum albumins induce hypha-formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *FASEB Journal*. 1997; 11: 1439
- 116 Kuriyama T., Williams D.W., Lewis M.A.: In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003; 18: 405-407
- 117 Kurnatowska A.J., Kurnatowski P.: Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikologia Lekarska*. 1998; 5: 213-217
- 118 Kurnatowski M., Wąsowska-Królikowska K., Kurnatowska A.: Badania mikologiczne próbek kału dzieci z objawami czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*. 2003; 5: 233-235
- 119 Kurtzman C.P., Fell J.W.: The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier; 1998

- 120 Kwon-Chung K.J.: Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *The Journal of Infectious Diseases*. 1979; 139: 424-431
- 121 Kwon-Chung K.J., Polacheck I., Popkin T.J.: Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology*. 1982; 150: 1414-1421
- 122 Laffey S.F., Butler G.: Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2005; 151: 1073-1081
- 123 Lanzafame M., de Checci G., Parinello A., Trevenzoli M., Cattelan A.M.: *Rhodotorula glutinis* - related meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 410
- 124 Lee S.H., Chiang S.S., Hseih S.J., Shen H.M.: Successful treatment of fungal peritonitis with intracatheter antifungal retention. *Advances in Peritoneal Dialysis*. 1995; 11: 172-175
- 125 Leeber D.A., Scher I.: *Rhodotorula fungemia* presenting as "endotoxic" shock. *Archives of Internal Medicine*. 1969; 123: 78-81
- 126 Leibovitz E., Rigaud M., Chandwani S., Kaul A., Greco M.A., Pollack H., Lawrence R., di John D.: Disseminated fungal infections in children infected with human immunodeficiency virus. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1991; 10: 888-894
- 127 Leung A.C.T., Orange G., Henderson I.S.: A case of *Rhodotorula rubra* peritonitis in CAPD patient: successful treatment without removal of the peritoneal catheter. *Peritoneal Dialysis International*. 1983; 3: 110
- 128 Li X., Yan Z., Xu J.: Quantitative variation of biofilms among strains in natural population of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2003; 149: 353-362
- 129 Libkind D., Sampaio J.P.: *Rhodotorula*. W: Liu. D [red.]. Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Press 2010, ss. 603-618
- 130 Lifshitz T., Levy J.: *Rhodotorula rubra* keratitis and melting after repeated penetrating keratoplasty. *European Journal of Ophthalmology*. 2005; 15: 135-137
- 131 Liu C.L., Ohtsuki K., Hatano H.: Inactivation of *Rhodotorula glutinis* acid protease by diazoacetyl compounds. *Journal of Biochemistry*. 1973; 73: 611-673
- 132 Lo H.J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R.: Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997; 90: 939-949

- 133 Lo Re III V., Fishman N.O., Nachamkin I.: Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003; 9: 897 - 900
- 134 Louria B.D., Blevins A., Armstrong D., Burdick R., Lieberman P.: Fungemia caused by “nonpathogenic” yeasts. *Archives of Internal Medicine*. 1967; 119: 247–252
- 135 Louria D.B., Greenberg S.M., Molander D.W.: Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the family Cryptococcaceae. Report of two cases due to *Rhodotorula* and *Torulopsis glabrata*. *The New England Journal of Medicine*. 1960; 263: 1281-1284
- 136 Lui A.Y., Turett G.S., Karter D.L., Bellman P.C., Kislak J.W.: Amphotericin B lipid complex therapy in an AIDS patient with *Rhodotorula rubra* fungemia. *Clinical Infectious Diseases*. 1999; 27: 892-893
- 137 Lunardi L.W., Aquino V.R., Zimerman R.A., Goldani L.Z.: Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43: 60-63
- 138 Maeder M., Vogt P.R., Schaer G., von Graevenitz A., Gunthard H.F.: Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Infection*. 2003; 31: 181-183
- 139 Mares D.: Ultrastructural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis* in the main growth phases. *Mycopathologia*. 1982; 80: 179-188
- 140 Marinova I.S., Szabadosova V., Brandeburova O., Krcmery Jr. V.: *Rhodotorula* spp. fungemia in an immunocompromised boy after neurosurgery successfully treated with miconazole and 5-flucytosine: case report and review of the literature. *Chemotherapy*. 1994; 40: 287-289
- 141 Mathews M.S., Ashbee H.R.: Emerging systemic yeast pathogens. W: Ashbee H.R., Bignell E.M. [red.]. The yeasts handbook. pathogenic yeasts. Springer, Heidelberg 2010, ss. 236-237
- 142 Mayser P., Laabs S., Heuer K.U., Grunder K.: Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia*. 1996; 135: 149-155
- 143 McCusker J.H., Clemons K.V., Stevens D.A., Davis R.W.: Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*. 1994; 136: 1261-1269
- 144 McCusker J.H., Clemons K.V., Stevens D.A., Davis R.W.: *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. *Infection and Immunity*. 1994; 62: 5447-5455

- 145 Melcher G.P., Reed K.D., Rinaldi M.G., Lee J.W., Pizzo P.A., Walsh T.J.: Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29: 192-196
- 146 Mendes A., Mores A.U., Carvalho A.P., Rosa R.T., Samaranyake L.P., Rosa E.A.: *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007; 30: 1813-1815
- 147 Merkur A.B., Hodge W.G.: *Rhodotorula rubra* endophthalmitis in an HIV positive patient. *The British Journal of Ophthalmology*. 2002; 86: 1444-1445
- 148 Mittag H.: Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses*. 1995; 38: 13-21
- 149 Mohan das V., Ballal M.: Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micologia: Organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*. 2008; 25: 208-210
- 150 Muderhwa J.M., Ratomahenina R., Pina M., Graille J., Galzy P.: Purification and properties of the lipases from *Rhodotorula pilimanae* Hedrick and Burke. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1986; 23: 348-354
- 151 Muralidhar S., Sulthana C.M.: *Rhodotorula* causing chronic dacryocystitis: a case report. *Indian Journal of Ophthalmology*. 1995; 43: 196-198
- 152 Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B.: *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology*. 2004; 6: 915-926
- 153 Navarro J.T., Lauzurica R., Giménez M.: *Rhodotorula rubra* infection in a kidney transplant patient with pancytopenia. *Haematologica*. 2001; 86: 111
- 154 Naveh Y., Friedman A., Merzbach D., Hashman N.: Endocarditis caused by *Rhodotorula* successfully treated with 5-fluorocytosine. *British Heart Journal*. 1975; 37: 101-104
- 155 Neofytos D., Horn D., De Simone J.A.: *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with sickle cell disease: case presentation and literature review. *Southern Medical Journal*. 2007; 100: 198-200
- 156 Nikawa H., Hamada T., Yamashiro H., Murata H., Subiwahjudi A.: The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. *Journal of Dentistry*. 1998; 26: 31-37

- 157 Nikawa H., Nishimura H., Makihira S., Hamada T., Sadamori S., Samaranayake L.P.: Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*. 2000; 43: 139-143
- 158 Nikawa H., Nishimura H., Yamamoto T., Hamada T., Samaranayake L.P.: The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1996; 9: 35-48
- 159 Noverr M.C., Cox G.M., Perfect J.R., Huffnagle G.B.: Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infection and Immunity*. 2003; 71: 1538-1547
- 160 Nucci M., Pulcheri W., Spector N., Beuno A.P., Bacha P.C., Caiuby M.J., Derossi A., Costa R.: Fungal infections in neutropenic patients: a 8-year prospective study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1995; 37: 397-406
- 161 Odds F.C., Abbot A.B., Stiller R.L., Scholer H.J., Polak A., Stevens D.A.: Analysis of *Candida albicans* phenotypes from different geographical and anatomical sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18: 849-857
- 162 Odds F.C., Abbott A.B.: Modification and extension of tests for differentiation of *Candida* species and strains. *Sabouraudia*. 1983; 21: 79-81
- 163 Ollert M.W., Wende C., Gorlich M., McMullan-Vogel C.G., Borg-von Zepelin M., Vogel C.W., Korting H.C.: Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33: 2543-2549
- 164 Otero L., Vazquez F., Palacio V., Vazquez S., Carreno F., Mendez F.J.: Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. *European Journal of Epidemiology*. 1995; 11: 221-224
- 165 Oyeka C.A., Ugwu L.O.: Fungal flora of human toe webs. *Mycoses*. 2002; 45: 488-491
- 166 Pamidimukkala U., Challa S., Lakshmi V., Tandon A., Kulkarni S., Raju S.Y.: Sepsis and meningoencephalitis due to *Rhodotorula glutinis* in a patient with systemic lupus erythematosus, diagnosed at autopsy. *Neurology India*. 2007; 55: 304-307
- 167 Panda A., Pushker N., Nainiwal S., Satpathy G., Nayak N.: *Rhodotorula* sp. infection in corneal interface following lamellar keratoplasty - a case report. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 1999; 77: 227-228
- 168 Papadogeorgakis H., Frangoulis E., Papaefstathiou C., Katsambas A.: *Rhodotorula rubra* fungaemia in an immunosuppressed patient. *Journal*

- of the *European Academy of Dermatology and Venereology*. 1999; 12: 169-170
- 169 Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., Maeris B.J.: Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*. 1992; 14: 397-402
- 170 Pasqualotto G.C., Copetti F.A., Meneses C.F., Leal Machado A.R., Brunetto A.L.: Infection by *Rhodotorula* sp. in children receiving treatment for malignant diseases. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2005; 27: 232-233
- 171 Pedroso R.S., Ferreira J.C., Lavrador M.A., Maffei C.M., Candido R.C.: Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. *Mycopathologia*. 2009; 168: 59-72
- 172 Pedroso R.S., Ferreira J.C., Candido R.C.: The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiological Research*. 2009; 164: 221-227
- 173 Pennington J.C.3., Hauer K., Miller W.: *Rhodotorula rubra* peritonitis in an HIV+ patient on CAPD. *Delaware Medical Journal*. 1995; 67: 184
- 174 Perniola R., Faneschi M.L., Manso E., Pizzolante M., Rizzo A., Sticchi Damiani A., Longo R.: *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006; 25: 193-196
- 175 Petrocheilou-Paschou V., Prifti H., Kostis E., Papadimitriou C., Dimopoulos M.A., Stamatelopoulos S.: *Rhodotorula* septicemia: case report and minireview. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001; 7: 100-102
- 176 Phongpaichit S., Mackenzie D.W.R., Fraser C.: Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidemiology and Infection*. 1987; 99: 421-428
- 177 Pien F.D., Thompson R.L., Deye D., Roberts G.D.: *Rhodotorula* septicemia: two cases and a review of the literature. *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clinic*. 1980; 55: 258-260
- 178 Pincus D.H., Salkin I.F., Hurd N.J., Levy I.L., Kemna M.A.: Modification of potassium nitrate assimilation test for identification of clinically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26: 366-368

- 179 Pinna A., Carta F.: Endogenous *Rhodotorula minuta* and *Candida albicans* endophthalmitis in an injecting drug user. *The British Journal of Ophthalmology*. 2001; 85: 754
- 180 Polo R.: Disseminated *Rhodotorula rubra* infection in an HIV-infected drug abuser. *The European Journal of Medicine*. 1993; 2: 252-253
- 181 Pore R.S., Chen J.: Meningitis caused by *Rhodotorula*. *Sabouraudia*. 1976; 14: 331-335
- 182 Price M.F., Wilkinson I.D., Gentry L.O.: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20: 7-14
- 183 Pytko-Polończyk J., Krzyściak P., Macura A.B.: Występowanie biotypów *Candida albicans* w jamie ustnej pacjentów z nowotworami nosogardzieli poddanych radioterapii. *Mikologia Lekarska*. 2008; 15: 197-200
- 184 R Development Core Team: R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2009
- 185 Raaijmakers R., Schröder C., Monnens L., Cornelissen E., Warris A.: Fungal peritonitis in children on peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*. 2007; 22: 288-293
- 186 Ramage G., Walle K.W., Wickes B.L., López-Ribot J.L.: Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 3234-3240
- 187 Ran Y., Yoshiike T., Ogawa H.: Lipase of *Malassezia furfur*: some properties and their relationship to cell growth. *Medical Mycology*. 1993; 31: 77-85
- 188 Rezza I., Salinas E., Calvente V., Benuzzi D., Tosetti M.: Extraction of lithium from spodumene by bioleaching. *Letters in Applied Microbiology*. 1997; 25: 172-176
- 189 Rezza I., Salinas E., Elorza M., Sanz de Tosettia M., Donati E.: Mechanisms involved in bioleaching of an aluminosilicate by heterotrophic microorganisms. *Process Biochemistry*. 2001; 36: 495-500
- 190 Richardson F., Lass-Flörl C.: Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14, suppl. 4: 5-24
- 191 Riciputo R.M., Oliveri S., Micali G., Sapuppo A.: Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses*. 1996; 39: 233-235
- 192 Riedel D.J., Johnson J.K., Forrest G.N.: *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. *Transplant Infectious Disease: an Official Journal of the Transplantation Society*. 2008; 10: 197-200

- 193 Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M.: RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. *Biotechnologia*. 2005; 4: 142-155
- 194 Rodrigues M.L., dos Reis F.C.G., Puccia R., Travassos L.R., Alviano C.S.: Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microbial Pathogenesis*. 2003; 34: 65-71
- 195 Román M.C., Linares Sicilia M.J.: Preliminary investigation of *Candida albicans* biovars. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18: 430-431
- 196 Romano A., Segal E., Ben-Tovim T.: Epithelial keratitis due to *Rhodotorula*. *Ophthalmologica. Journal International D'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 1973; 166: 353-359
- 197 Rosa N.G., Silva S., Lopes J.A., Branco P., de Almeida E., Ribeiro C., Abreu F., Barbas J.: Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients: Is previous antibiotic therapy an essential condition? *Mycoses*. 2007; 50: 79-81
- 198 Rosewich U.L., Kistler H.C.: Role of horizontal gen transfere in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 2000; 38: 325-363
- 199 Rüchel R., de Bernardis F., Ray T.L., Sullivan P.A., Cole G.T.: *Candida* acid proteinases. *Journal of Medical and Veterinary Mycology: Bi-Monthly Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 1992; 30 supl. 1: 123-132
- 200 Ruiz-Aragón J., García-Agudo L., García-Martos P., Marín P., García-Tapia A., Moya P.: Enzymatic activity of *Rhodotorula glutinis* strains isolated from clinical and environmental sources. *Mikologia Lekarska*. 2005; 12: 11-13
- 201 Ruma-Haynes P., Brownlee A.G., Sorrell T.C.: A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2000; 49: 733-737
- 202 Rusthoven J.J., Feld R., Tuffnell P.G.: Systemic infection by *Rhodotorula* spp. in the immunocompromised host. *Journal of Infection*. 1984; 8: 241-246
- 203 Samaranyake L.P., McCourtie J., MacFarlane T.W.: Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology*. 1980; 25: 611-615
- 204 Samarayanake L.P., Raeside J.M., MacFarlane T.W.: Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*. 1984; 22: 201-207

- 205 Samonis G., Anatoliotaki M., Apostolakou H., Maraki S., Mavroudis D., Georgoulis V.: Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a cancer patient: case report and review of the literature. *Infection*. 2001; 29: 173-176
- 206 Samonis G., Bafaloukos D.: Fungal infection in cancer patients: an escalating problem. *In Vivo (Athens, Greece)*. 1992; 6: 183-194
- 207 Saracli M.A., Sener K., Gonlum A., Yildiran S.T., Wickes B.L.: Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis. *Mycoses*. 2003; 46: 11-12
- 208 Savini V., Sozio F., Catavittello C., Talia M., Manna A., Febbo F., Balbinot A., di Bonaventura G.: Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 3544-3545
- 209 Schaller M., Bein M., Korting H.C., Baur S., Hamm G., Monod M., Beinhauer S., Hube B.: The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an In vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* 2003; 71: 3227-3234
- 210 Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B.: Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005; 48: 365-377
- 211 Schaller M., Hube B., Ollert M.W., Schäfer W., Borg-von Zepelin M., Thoma-Greber E., Korting H.C.: In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999; 112: 383-386
- 212 Segal E., Romano A., Eylan E., Stein R., Ben-Tovim T.: *Rhodotorula rubra* - cause of eye infection. *Mykosen*. 1975; 18: 107-111
- 213 Sekhar S., Kumar R., Chakraborti A.: Role of biofilm formation in the persistent colonization of *Haemophilus influenzae* in children from northern India. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58: 1428-1432
- 214 Sequeira H., Silva S., Silva P., Almeida E., Abreu F., Barbas J., Martins-Prata M., Marques-Gomes M.: *Rhodothorula mulcilaginosa* peritonitis in a patient on ambulatory peritoneal dialysis. *Mycoses*. 2005; 46, suppl. 2: 96-97
- 215 Shelburne P.F., Carey R.J.: *Rhodotorula* fungemia complicating staphylococcal endocarditis. *The Journal of the American Medical Association*. 1962; 180: 38-42
- 216 Sheu M.J., Wang C.C., Wang C.C., Shi W.J., Chu M.L.: *Rhodotorula* septicemia: report of a case. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*. 1994; 93: 645-647

- 217 Shinde R.S., Mantur B.G., Patil G., Parande M.V., Parande A.M.: Meningitis due to *Rhodotorula glutinis* in an HIV infected patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2008; 26: 375-377
- 218 Siersted H.C., Gravesen S.: Extrinsic allergic alveolitis after exposure to the yeast *Rhodotorula rubra*. *Allergy*. 1993; 48: 298-299
- 219 Silva J., Runco de Laborda R., Almendro G., Salim R.: *Rhodotorula glutinis* and *R. rubra*: agents of opportunistic mycoses in man. *Boletín Micológico*. 1989; 4: 171-174
- 220 Simpanya M.F.: Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. W: Kushwaha R.K.S., Guarro J. [red.]. *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao 2000, ss. 1-12
- 221 Singh N.: Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33: 1692-1696
- 222 Soll D.R.: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13: 332-370
- 223 Soylu A., Demircioglu F., Türkmen M., Yücesoy M., Kavukçu S.: Unusual cause of peritonitis during peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*. 2004; 19: 1426-1428
- 224 Srivastava K.C., Smith D.G.: The fine structure of psychrophilic and mesophilic *Rhodotorula rubra*. *Cytobios*. 1979; 26: 57-66
- 225 St Geme J.W., Falkow S.: Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infection and Immunity*. 1991; 59: 1325-1333
- 226 Staib F.: Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia*. 1965; 4: 187-193
- 227 Stehr F., Kretschmar M., Kröger C., Hube B., Schäfer W.: Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003; 22: 347-355
- 228 Struve C., Krogfelt K.A.: Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 218: 149-154
- 229 Thakur K., Singh G., Agarwal S., Rani L.: Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2007; 25: 166-168

- 230 Thanos L., Mylona S., Kokkinaki A., Pomoni M., Tsiouris S., Batakis N.: Multifocal skeletal tuberculosis with *Rhodotorula minuta* co-infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2006; 38: 309-311
- 231 Torres-Rodriguez J.M., Alvarado-Ramirez E.: In vitro susceptibilities to yeasts using the ATB FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60: 658-661
- 232 Tsuboi R., Komatsuzaki H., Ogawa H.: Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infection and Immunity*. 1996; 64: 2936-2940
- 233 Tuon F.F., Costa S.F.: *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista Iberoamericana de Micología: Organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micología*. 2008; 25: 135-140
- 234 Tuon F.F., de Almeida G.M., Costal S.F.: Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. - a systematic review. *Medical Micology*. 2007; 45: 441-447
- 235 Ünal A., Koc A., Sipahioglu M.H., Kavuncuoglu F., Tokgoz B., Buldu H.M., Oymak O., Utas C.: CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 2009; 29: 581-582
- 236 Vartivarian S.E., Anaissie E.J., Cowart R.E., Sprigg H.A., Tingler M.J., Jacobson E.S.: Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *The Journal of Infectious Diseases*. 1993; 167: 186-190
- 237 Vidotto V., Koga-Ito C.Y., Canella D., Sinicco A., Di Perri G., Aoki S., Ito-Kuwa S.: Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Revista Iberoamericana de Micología: Organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micología*. 2000; 17: 14-19
- 238 Volz P.A., Hunter R.L.: Pseudohyphal variations of yeasts exposed to specific space flight parameters. *Microbios*. 1998; 95: 25-34
- 239 Walsh T.J., Gonzalez C., Roilides E., Mueller B.U., Ali N., Lewis L.L., Whitcomb T.O., Marshall D.J.: Fungemia in children infected with the human immunodeficiency virus: new epidemiologic patterns, emerging pathogens, and improved outcome with antifungal therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 1995; 20: 900-906
- 240 Warnock D.W., Speller D.C.E., Day J.K., Farrell A.J.: Resistogram method for differentiation of strains of *Candida albicans*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1979; 46: 571-578

- 241 Watrud L.S.: Comparison of taxonomic, colony morphotype and PCR-RFLP methods to characterize microfungal diversity. *Mycologia*. 2006; 98: 384-392
- 242 Wawer P.: Grzybica rogówki spowodowana przez *Rhodotorula*, wyleczona keratoplastyka z przywróceniem wzroku. *Klinika Oczna*. 1965; 35: 451-453
- 243 Williamson M.I., Samaranayake L.P., MacFarlane T.W.: Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1986; 24: 81-84
- 244 Williamson M.I., Samaranayake L.P., MacFarlane T.W.: Biotypes of *Candida albicans* using the API 20C system. *FEMS Microbiology Letters*. 1986; 37: 27-29
- 245 Wong V., Ross L., Opas L., Lieberman E.: *Rhodotorula rubra* peritonitis in a child undergoing intermittent cycling peritoneal dialysis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998; 157: 393-394
- 246 Wood M., Roxby C.M., Gould K., Martin A.M.: Peritonitis due to *Rhodotorula glutinis* in a patient on CAPD. *Peritoneal Dialysis International*. 1985; 5: 205-206
- 247 Wood W.B., Davis B.D.: Host-parasite relations in bacterial infections. W: Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S. [red.]. *Microbiology*. Harper & Row, Cambridge, Mass 1980, ss. 551-571
- 248 Wójcik A., Rózga A., Kurnatowski P.: Some biochemical properties of fungi from genera *Rhodotorula* and *Trichosporon* isolated from Sulejów reservoir bath water. *Wiadomości Parazytologiczne*. 2004; 50: 151-156
- 249 Ying S., Qing S., Chunyang L.: The effect of gentian violet on virulent properties of *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2010; 169: 279-285
- 250 Young C., Chang M.H., Chen J.M.: Fungal esophagitis in children. *Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui za Zhi [Journal]*. *Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui*. 1993; 34: 436-442
- 251 Zaas A.K., Boyce M., Schell W., Lodge B.A., Miller J.L., Perfect J.R.: Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 5233-5235
- 252 Zaragoza O., Casadevall A.: Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological Procedures Online*. 2004; 6: 10-15
- 253 Zaragoza O., Rodrigues M.L., De Jesus M., Frases S., Dadachova E., Casadevall A.: The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*. 2009; 68: 133-216

INDEKS TABEL

1. **Tabela 2.1:** Przypadki fungemii i zakażeń uogólnionych wywołanych przez *Rhodotorula* sp..... 12
2. **Tabela 2.2:** Przypadki zakażeń OUN wywołane przez *Rhodotorula* sp..... 18
3. **Tabela 2.3:** Przypadki zapalenia otrzewnej w wyniku zakażenia *Rhodotorula* sp.. 19
4. **Tabela 2.4:** Zakażenia oka wywołane *Rhodotorula* sp..... 21
5. **Tabela 2.5:** Inne zakażenia wywołane *Rhodotorula* sp*. 22
6. **Tabela 4.1:** Enzymy i ich substraty w teście API ZYM firmy BioMérieux..... 33
7. **Tabela 5.1:** Biotypy *R. mucilaginosa* uzyskana na podstawie występowania aktywności trzech enzymów w teście API ZYM..... 43
8. **Tabela 5.2:** Biotypy uzyskane na podstawie różnic w aktywności glukozydaz w teście API ZYM..... 44
9. **Tabela 5.3:** Porównanie średnich absorbancji tworzenia biofilmu przez badane gatunki grzybów..... 63
10. **Tabela 5.4:** Wrażliwość szczepów *Rhodotorula* sp. na leki przeciwgrzybicze..... 64
11. **Tabela 5.5:** Lekowrażliwość *Rhodotorula* sp. wyrażona odsetkiem szczepów wykazujących daną wartość MIC. Liczba szczepów (procent) skumulowany procent..... 65
12. **Tabela 6.1:** Porównanie intensywności wzrostu w teście tolerancji temperatury i na podłożu do oceny aktywności proteolitycznej w 37°C..... 78

INDEKS RYCIN

1. Rycina 2.1: Makro- i mikromorfologia <i>Rhodotorula</i> sp.....	8
2. Rycina 2.2: Udział poszczególnych gatunków w opisanych przypadkach zakażeń wywołanych przez <i>Rhodotorula</i>	9
3. Rycina 2.3: Liczba przypadków zakażeń wywołanych przez <i>Rhodotorula</i> sp. w kolejnych dekadach.....	11
4. Rycina 2.4: Częstość występowanie różnych postaci zakażeń wywołanych przez <i>Rhodotorula</i> sp.....	11
5. Rycina 2.5: Klasy patogenności mikroorganizmów.....	27
6. Rycina 4.1: Wynik testu asymilacji azotanów dla przykładowych szczepów <i>Rhodotorula</i>	30
7. Rycina 4.2: Sposób wyznaczania wartości <i>Pz</i>	32
8. Rycina 5.1: Procentowy udział gatunków <i>Rhodotorula</i> w badanym materiale.....	40
9. Rycina 5.2: Źródła izolowanych szczepów <i>Rhodotorula</i>	41
10. Rycina 5.3: Udział gatunków <i>Rhodotorula</i> w poszczególnych lokalizacjach.....	41
11. Rycina 5.4: Rozkład aktywności enzymów wybranych do biotypowania.....	42
12. Rycina 5.5: Częstość występowania poszczególnych biotypów <i>R. mucilaginosa</i> ..	43
13. Rycina 5.6: Podobieństwo enzymogramów i biotypy <i>R. mucilaginosa</i> przedstawione na dendrogramie.	45
14. Rycina 5.7: Dendrogram podobieństwa enzymogramów szczepów <i>R. mucilaginosa</i> powstały w wyniku klasteryzacji metodą UPGMA.....	45
15. Rycina 5.8: Rozkład intensywności wzrostu szczepów <i>R. mucilaginosa</i> w temperaturze 37°C.....	46
16. Rycina 5.9: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku <i>R. glutinis</i>	47

17. Rycina 5.10: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku <i>R. minuta</i>	48
18. Rycina 5.11: Aktywność enzymatyczna w teście API ZYM grzybów z gatunku <i>R. mucilaginosa</i>	49
19. Rycina 5.12: Porównanie aktywności wybranych enzymów w teście API ZYM dla grzybów z rodzaju <i>Rhodotorula</i>	50
20. Rycina 5.13: Porównanie aktywności wybranych enzymów w teście API ZYM dla grzybów z rodzaju <i>Rhodotorula</i> – c.d.....	51
21. Rycina 5.14: Oznaczenie aktywności fosfolipazy na podłożu EYA.....	53
22. Rycina 5.15: Aktywność fosfolipazy wyrażona wartością Pz.....	53
23. Rycina 5.16: Częstość występowania aktywnych proteolitycznie (kolor szary) szczepów <i>R. mucilaginosa</i> i <i>C. albicans</i>	54
24. Rycina 5.17: Oznaczenie aktywności proteiny aspartylowej na podłożu BSAA.	55
25. Rycina 5.18: Porównanie aktywności proteolitycznej szczepów <i>R. mucilaginosa</i> (<i>R.muc37</i>) i <i>C. albicans</i> (<i>C.alb37</i>) na podłożu z albuminą bydlęcą w 37°C.....	55
26. Rycina 5.19: Porównanie aktywności lipolitycznej w 27°C szczepów z rodzaju <i>Rhodotorula</i>	56
27. Rycina 5.20: Oznaczenie aktywności lipazy na podłożu z mieszaniną Tweenów..	57
28. Rycina 5.21: Porównanie aktywności lipolitycznej szczepów <i>R. mucilaginosa</i> i <i>C. albicans</i>	57
29. Rycina 5.22: Pseudostrzępki wytworzone przez <i>R. mucilaginosa</i> po pięciodniowej inkubacji w surowicy w temperaturze 37°C.....	59
30. Rycina 5.23: Częstość występowania przejścia z fazy drożdżowej do strzępkowej (D-M) szczepów <i>R. mucilaginosa</i>	59
31. Rycina 5.24: Częstość występowania otoczek wśród szczepów poszczególnych gatunków <i>Rhodotorula</i>	60

32. Rycina 5.25: Otoczki <i>Rhodotorula</i> sp. Barwienie tuszem chińskim.....	60
33. Rycina 5.26: Porównanie badanych gatunków pod względem ilości szczepów tworzących biofilm w surowicy.....	61
34. Rycina 5.27: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez gatunki <i>Rhodotorula</i> w podłożu YNB i surowicy bydlęcej.....	62
35. Rycina 5.28: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu w zależności od zastosowanej pożywki dla <i>C. albicans</i>	62
36. Rycina 5.29: Porównanie intensywności tworzenia biofilmu w YNB i surowicy przez szczepy <i>R. mucilaginosa</i> (R.muc) i <i>C. albicans</i> (C. alb).....	63
37. Rycina 6.1: Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy należące do różnych biotypów <i>R. mucilaginosa</i>	70
38. Rycina 6.2: Porównanie aktywności hydrolaz między biotypami <i>R. mucilaginosa</i>	71
39. Rycina 6.3: Rozkład wartości aktywności fosfolipazy.	76
40. Rycina 6.4: Otoczki <i>R. mucilaginosa</i> według Thakur i wsp.....	82
41. Rycina 6.5: Zależność między intensywnością wzrostu w 37°C a tworzeniem biofilmu w określonej pożywce.....	84
42. Rycina 6.6: Etapy rozwoju biofilmu.....	85
43. Rycina 6.7: Rozkład wartości MIC dla FLZ i ITZ wśród badanych szczepów <i>R. mucilaginosa</i>	87

10.1 Wykaz odczynników i aparatury

10.1.1 Odczynniki

10.1.1.1 PODŁOŻA

1. Podłoże Sabourauda z chloramfenikolem (SGA)

Podłoże firmy Biocorp.

Mieszanka peptonów.....	10,0 g
Glukoza.....	40,0 g
Chloramfenikol.....	0,5 g
Agar.....	15,0 g
pH 5,6 +/- 0,2	

2. 10-krotnie rozcieńczone podłoże SGA

Jest to bulion Sabourauda rozcieńczony najczęściej wodą w proporcji 1:9. Istnieją również modyfikacje rozcieńczalnika, którym może być PBS, MOPS 50 mmol pH 7,3 lub HEPES 5 mmol pH 7,3. Służy do indukcji tworzenia otoczek [252].

3. Podłoże do oceny asymilacji azotanów

Podłoże według Pincus i wsp. [178]

KNO ₃	1,40 g
Yeast Carbon Base.....	1,60 g
Błękit bromotymolowy.....	0,12 g
Agar Noble'a.....	16,00 g
dH ₂ O.....	1,00 l
pH 5,9-6,0	

4. Podłoże EYA do oznaczania aktywności fosfolipazy

EYA (Egg Yolk Agar) podłoże z emulsją z żółtek jaj kurzych (200 ml)

SGA.....	13,00 g
NaCl.....	11,70 g
CaCl ₂	0,11 g
Jałowe żółtka kurze.....	10,00%

Żółtko należy wirować przy 500g przez 10 min; 20 ml supernatantu dodać do jałowego podłoża.

Jałowa woda.....	184 ml
------------------	--------

5. Podłoże BSAA do oznaczenia aktywności proteinaz

BSAA (Bovine Serum Albumin Agar) podłoże z albuminą bydlęcą

MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,04 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
NaCl.....	1,00 g
Wyciąg drożdżowy.....	0,20 g
Glukoza.....	4,00 g
BSA.....	0,50 g

pH = 3,5 ± 2

6. Podłoże Tweenowe

Podłoże zawierające w sym składzie mieszaninę 4 Tweenów: Tweenu 20, 40, 60, 80.

Pepton.....	10,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCl ₂ H ₂ O.....	0,1 g
Agar.....	20,0 g
Mieszanina Tweenów.....	1,0 ml / 100 ml podłoża
pH=5,5	

7. Wyjściowe podłoże azotowe (YNB)

Biotyna.....	2 µg
Pantotenian wapnia.....	400 µg
Kwas foliowy.....	2 µg
Inozytol.....	2000 µg
Niacyna.....	400 µg
Kwas p-aminobenzoesowy.....	200 µg
Chlorowodorek pirodoksyny.....	400 µg
Ryboflawina.....	200 µg
Chlorowodorek tiaminy.....	400 µg
Kwas borowy.....	500 µg
Siarczan miedzi.....	40 µg
Jodek potasu.....	100 µg
Chlorek żelaza.....	200 µg
Siarczan manganu.....	400 µg
Molibdenian sodu.....	200 µg
Siarczan cynku.....	400 µg
Fosforan potasu jednozasadowy.....	1 g
Siarczan magnezu.....	500 mg
Chlorek sodu.....	100 mg
Chlorek wapnia.....	100 mg

8. Surowica bydlęca (Biomed Lublin)

Naturalne źródło substancji białkowych. Nie traci wartości odżywczych przy wielokrotnym zamrażaniu i rozmrażaniu. Pochodzi z krwi zwierząt zdrowych klinicznie, wolnych od chorób zakaźnych, przebadanych przez lekarza weterynarii. Sterylizowana jest przez filtrację. pH wynosi $7,8 \pm 0,3$, osmomolarność 260-320 mOsmol/l, zawartość białka całkowitego (6,0- 9,0 %).

9. Podłoże niskożelazowe (LIM)

Podłoże niskożelazowe (LIM, ang. *Limited Iron Medium*) jest jednym z najczęściej stosowanych podłoży do indukcji tworzenia otoczek. Opisane zostało przez Vartivarian i wsp. [236].

Glukoza.....	5,00 g
K ₂ PO ₄	0,40 g
Asparagina.....	5,00 g
CaCl ₂	0,25 g
Tiamina.....	0,40 mg
CuSO ₄	5,00 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	2,00 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O.....	0,01 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,46 mg
Kwas borowy.....	0,057 mg

10.1.1.2 BARWNIKI**1. 0,4 % roztwór fioletu krystalicznego**

Fiolet krystaliczny.....	4 g
dH ₂ O.....	1000 ml

10.1.1.3 BUFORY**1. Bufor fosforanowy (PBS)**

NaCl.....	(140,0 mmol)	8,2 g
KCl.....	(2,7 mmol)	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	(8,5 mmol)	1,2 g
KH ₂ PO ₄	(1,8 mmol)	0,2 g
pH	7,4	

10.1.2 Aparatura

W wykonanych badaniach użyto następującego sprzętu laboratoryjnego.

- 1) Densytometr – BioSan, DEN-1
- 2) Cieplarki
- 3) Wirówka – MPW Med. Instruments – MPW-251
- 4) Czytnik ELISA – Biotek
- 5) Mikroskop świetlny – Motic, B3 Professional Series
- 6) Wyrząsarka orbitalna – Elmi, DOS-20S
- 7) Wyrząsarka typu Vortex – Labnet Int., Vortex Mixer S0200
- 8) Pipety automatyczne:
 - a) Pipety o zmiennej objętości firmy HTL
 - b) Pipeta wielokanałowa firmy Ependorff